

# Identificación de factores implicados en la resistencia del carcinoma basocelular a la Terapia Fotodinámica

Tesis Doctoral  
**Silvia Rocío Lucena Blas**  
Madrid, 2017

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DOCTORADO EN BIOCIENCIAS MOLECULARES



**Identificación de factores implicados en  
la resistencia del carcinoma basocelular a la  
Terapia Fotodinámica**

Tesis Doctoral

**Silvia Rocío Lucena Blas**

Madrid, 2017

Madrid, 2017  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR  
FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID



# **Identificación de factores implicados en la resistencia del carcinoma basocelular a la Terapia Fotodinámica**

Memoria para optar al grado de Doctor por la licenciada en Biología:

**Silvia Rocío Lucena Blas**

Directora de Tesis: Dra. Ángeles Juarranz de la Fuente

Universidad Autónoma de Madrid

Dña. Ángeles Juarranz de la Fuente, Catedrática de Biología Celular de la  
Universidad Autónoma de Madrid

CERTIFICA:

Que Doña Silvia Rocío Lucena Blas ha realizado el trabajo de Tesis Doctoral  
que lleva por título: “**Identificación de factores implicados en la resistencia del  
carcinoma basocelular a la Terapia Fotodinámica**” bajo mi dirección y  
supervisión.

Que, una vez revisado el trabajo, considero que éste tiene la debida calidad  
para su presentación y defensa.

Y para que conste a los efectos oportunos firmo la presente en Madrid a 9 de  
junio de 2017.

Ángeles Juarranz de la Fuente

Catedrática de Biología Celular

Dpto. Biología, UAM



El desarrollo de esta Tesis Doctoral ha contado con la siguiente financiación:

- Silvia Rocío Lucena Blas ha disfrutado de un contrato predoctoral de Formación de Personal Investigador (FPI) de la Universidad Autónoma de Madrid, durante el periodo comprendido entre 01/10/2013 y el 30/09/2017.

- Título del proyecto: "*Evaluación de la eficacia de la terapia fotodinámica en el tratamiento de cáncer cutáneo no melanoma mediante su combinación con terapias co-adyuvantes*". Entidad financiadora: Fondo de Investigaciones Sanitarias, Ministerio de Economía y Competitividad (PI12/01253). Duración: 01/01/2013-31/12/2014. Investigador responsable: Ángeles Juarranz de la Fuente.

- Título del proyecto: "*Determinación de marcadores de resistencia a terapia fotodinámica en el tratamiento de cáncer cutáneo no melanoma y búsqueda de estrategias para superarla*". Entidad financiadora: Fondo de Investigaciones Sanitarias, Ministerio de Economía y Competitividad (PI15/00974). Duración: 01/01/2015-31/12/2017. Investigador responsable: Ángeles Juarranz de la Fuente.

*A mis padres  
y a mi hermana*

*“La investigación es uno de los factores primordiales de la universidad, que sin creación no es digna de tal nombre.”*

Felipe Lucena Conde  
(1962, Rector de la Universidad de Salamanca)

*“Yo soy de las que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. Un científico en su laboratorio no es solo un técnico, también es un niño colocado ante fenómenos naturales que lo impresionan como un cuento de hadas”*

Marie Curie

## *Agradecimientos*

---

Después de todo el esfuerzo y el trabajo que requiere una Tesis Doctoral, ¡al fin un apartado que resulta sencillo redactar! Quiero agradecer a todas las personas que han contribuido al desarrollo de este trabajo de una forma u otra, especialmente:

A mi directora de tesis Ángeles Juarranz la oportunidad que me ha brindado de poder realizar este trabajo en el campo de la Terapia Fotodinámica y el cáncer de piel, así como sus consejos y los conocimientos que me ha transmitido a lo largo de todos estos años. Así como al Dr. Francisco Sanz por permitirme introducirme en la investigación en el área de Biología Celular.

Al Dr. Pål Kristian Selbo, por su atención, la ayuda prestada y las ideas aportadas a este trabajo, que han sido muy enriquecedoras.

Asimismo, quiero agradecer su aportación a esta tesis a la Dra. Montserrat Fernández-Guarino por facilitarme parte del material biológico empleado, así como a los patólogos Israel Bernal y Miguel Ángel Marigil, su colaboración con la evaluación de las biopsias de tejido.

A todos los que pasaron por el A-102, aquellos con los que no solo he compartido laboratorio en algún momento, sino que he compartido también alegrías, penas, momentos de éxito y de frustración y muchos muchos (muchos muchos) *Western Blots*; pero que siempre han acabado con risas o palabras de consuelo. Gracias Marta, Nerea, Joyce, Berenice,... De entre todos ellos, especialmente, quiero dar las gracias a aquellos compañeros con los que tras compartir días de ordenador y cabina se terminaron convirtiendo en amigos: Maritere, la más loca, gracias por tantos buenos ratos, eres única; y Carlos, mil gracias por tantas risas, por hacer que el tiempo pasara mucho más deprisa y que el trabajo fuera siempre tan ameno. Gracias por esas cenas, que aunque se suelen hacer esperar, siempre merecen la pena.

Y como no podía ser de otra manera, muchísimas gracias a Ali. Gracias por estar ahí desde el inicio, por ser mi compañera de pupitre y presentaciones en alemán, mi confidente, mi apoyo y mi amiga; por tu inmensa ayuda y colaboración con este trabajo tanto en la parte experimental como en el documento (y sí, para mí, cinco años después, sigues siendo “La crack de la TFD”); sin ti esto habría sido prácticamente imposible.

Tampoco quiero olvidarme de las personas con las que he compartido durante estos años otra parte muy importante de mi vida: la política, tanto dentro como fuera de la universidad. Con ellos he aprendido mucho y les quiero agradecer todo su trabajo, especialmente, en la defensa de una investigación digna y de calidad en este país y de la

mejora de las condiciones laborales de los investigadores predoctorales; así como su interés por intentar comprender mi trabajo.

A mis amigas y amigos de siempre. Gracias por todos los momentos vividos, por comprender mis ausencias y por estar siempre ahí.

Gracias de forma muy especial a José, mi compañero de vida y mi pareja de baile, por creer en mí y apoyar mi trabajo, aunque nunca llegues a entender eso de “curar el cáncer con luz”; por compartir conmigo el tramo más difícil de este proceso, por tener siempre una palabra de ánimo para mí, por tu alegría y por todo tu amor.

Gracias a mis abuelos Josefa y Manuel, que siempre me dijeron que podría llegar dónde yo quisiera, recordándome el valor del trabajo y la constancia; y a mi abuela Mimma, por su cariño y por mantener vivo el recuerdo de mi abuelo Felipe.

Muchísimas gracias a mi hermana Laura y a mi cuñado Matthew por su ayuda con algunos pequeños flecos de este trabajo. Gracias a mi *sorella* por diseñar la preciosa cubierta, por confiar siempre en mí y porque, a pesar de la distancia y lo distintas que somos en muchos aspectos, ha estado disponible cada vez que la he necesitado.

Y por último, mi mayor GRACIAS es para mis padres por hacerme sentir curiosidad por el porqué de las cosas desde pequeña y por permitirme estar cerca de la ciencia cuando la bata me llegaba a los pies y tenía que doblar las mangas medio metro para que me asomaran las manos. Gracias por ayudarme y aconsejarme cuando lo he necesitado, por estar siempre disponibles para mí, por ser mi mayor apoyo y creer en mis capacidades. Os agradezco vuestra infinita paciencia al final de este proceso y todo vuestro cariño. Os quiero y sin vosotros nunca habría podido llegar hasta aquí.



## Abreviaturas

---

10 <sup>8</sup> G	Población de células resistente a 10 ciclos de TFD-MAL
10 <sup>8</sup> G T	Población de células aislada a partir de la inoculación de células 10 <sup>8</sup> G en modelo murino
3T3	Fibroblastos murinos inmortalizados
5-FU	5-Fluorouracilo
$\alpha$ -SMA	Actina del músculo liso ( <i>Alpha-Smooth Muscle Actin</i> )
$\beta$ -cat	$\beta$ -catenina
ABCG2 o BCRP	<i>ATP-Binding Cassette sub-family G member 2</i>
ALA	Ácido-5-aminolevulínico
ALDH	Aldehído deshidrogenasa
APC	<i>Adenomatous polyposis coli</i>
ASZ	Línea celular murina de carcinoma basocelular con p53
BCA	Ácido Bicinconínico
BCL-2	<i>B-Cell Lymphoma 2</i>
BSZ	Línea celular murina de carcinoma basocelular sin p53
CAFs	Fibroblastos asociados a cáncer ( <i>Cancer Associated Fibroblasts</i> )
CBC	Carcinoma basocelular
CCNM	Cáncer cutáneo no melanoma
CDK (1 $\alpha$ )	Quinasa dependiente de ciclina (1 $\alpha$ )
CE	Carcinoma escamoso
CF	Contraste de fases
CM	Células madre
CMCs	Células madre del cáncer
CSZ	Línea celular murina de carcinoma basocelular espontáneo sin p53
DAB	Diaminobenzidina
DHF-DA	Dihidrofluoresceína Diacetato
E-cad	E-cadherina
EGF	Factor de crecimiento epidérmico ( <i>Epidermal Growth Factor</i> )
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
FAP-1	<i>Fibroblast Activation Protein-1</i>
FS	Fotosensibilizador
FSP-1 o S100A4	<i>Fibroblast Specific Protein 1</i>
GAL-1	Galectina-1
GCL	Glutamato cisteína ligasa
GLI	<i>Glioma-associated oncogene homologue</i>
GSK3 $\beta$	Glucógeno sintasa quinasa 3 $\beta$
GSS	Glutación sintetasa
HGF	<i>Hepatocyte Growth Factor</i>
HH	<i>Hedgehog</i>

<b>HIF-1</b>	<i>Hypoxia-Inducible Factor-1</i>
<b>HO-1 o HMOX-1</b>	Hemooxigenasa-1
<b>Hp</b>	Hematoporfirina
<b>HSP</b>	Proteínas de choque térmico ( <i>Heat Shock Proteins</i> )
<b>IF</b>	Inmunofluorescencia
<b>IHQ</b>	Inmunohistoquímica
<b>IL-6</b>	Interleuquina-6
<b>KGM</b>	<i>Keratinocytes Growth Medium</i>
<b>LED</b>	<i>Light Emission Diode</i>
<b>N-cad</b>	N-cadherina
<b>NF-κB</b>	<i>Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
<b>mTOR</b>	<i>mammalian Target of Rapamycin</i>
<b>MAL</b>	Metil aminolevulinato
<b>MC</b>	Medio de cultivo condicionado con los fibroblastos control SL01
<b>MDR /ABC</b>	<i>Multidrug Resistance / ATP Binding Cassette</i>
<b>MEC</b>	Matriz extracelular
<b>MI</b>	Medio de cultivo condicionado con fibroblastos aislados del CBC invasivo SL15
<b>MMP</b>	Metaloproteinasa
<b>Oct4</b>	<i>Octamer-Binding Transcription Factor 4</i>
<b>P</b>	Población celular Parental de células no resistentes a TFD
<b>P/S</b>	Penicilina/Estreptomicina
<b>P19</b>	Células con características de células madre de carcinoma embrionario de ratón
<b>PDPN</b>	Podoplanina
<b>PgP</b>	<i>P-glicoprotein / ATP-Binding Cassette sub-family B member 1</i>
<b>PKB o AKT</b>	Proteína quinasa B
<b>PpIX</b>	Protoporfirina IX
<b>P T</b>	Población celular aislada a partir de la inoculación de células P en modelo murino
<b>PTCH</b>	<i>Patched</i>
<b>QA</b>	Queratosis actínica
<b>RE</b>	Retículo endoplasmático
<b>RIN</b>	Número de integración del ARN ( <i>RNA Integrity Number</i> )
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno ( <i>Reactive Oxygen Species</i> )
<b>SDF-1</b>	<i>Stromal-Derived Factor-1</i>
<b>SHH</b>	<i>Sonic Hedgehog</i>
<b>SOD</b>	Superóxido dismutasa
<b>Sox2</b>	<i>Sex determining Region Y-box 2</i>
<b>TEM</b>	Transición epitelio-mesénquima
<b>TFD</b>	Terapia fotodinámica
<b>TGF-β</b>	<i>Transforming Growth Factor-β</i>
<b>UCP2</b>	<i>Uncoupling Protein 2</i>
<b>WB</b>	<i>Western Blot</i>

## Resumen

---

El carcinoma basocelular (CBC) es el cáncer cutáneo con mayor incidencia a nivel mundial; aparece en zonas fotoexpuestas y es altamente mutilante. Uno de sus tratamientos aprobados es la terapia fotodinámica (TFD), tras la cual pueden aparecer recidivas. El objetivo de este trabajo fue estudiar los mecanismos responsables de las mismas. Para evaluar posibles mecanismos intrínsecos se emplearon 3 líneas de CBC murino (P) heterocigotas para el gen *ptch*: ASZ, BSZ y CSZ. La línea ASZ expresa el gen *p53* mientras que BSZ y CSZ carecen del mismo. A partir de las P se generaron células resistentes a 10 ciclos de TFD-MAL (10<sup>a</sup>G) y, tras la inoculación de ambas en ratones inmunosuprimidos, se aislaron las P T y 10<sup>a</sup>G T. Las 10<sup>a</sup>G presentaron mayor capacidad tumorigénica que las P. El fotosensibilizador protoporfirina IX (PpIX) se localizó en la membrana en todas las líneas, y en ASZ y BSZ P se observó también en el núcleo; CSZ P produjo una mayor cantidad de PpIX que su 10<sup>a</sup>G. Todas las poblaciones 10<sup>a</sup>G y 10<sup>a</sup>G T presentaban una morfología más fusiforme y una mayor presencia de células madre del cáncer (CMCs). Además, la evaluación de proteínas de progresión tumoral apuntó hacia la adquisición de características de transición epitelio-mesénquima (TEM) y la alteración de la ruta Wnt/ $\beta$ -cat dependientes de p53: ASZ mostró una mayor expresión de N-cadherina y de Gsk3 $\beta$  (quinasa represora de la ruta), mientras que en BSZ y CSZ disminuía la expresión de las proteínas de adhesión (E-cadherina y  $\beta$ -catenina) y de Gsk3 $\beta$ . Como factor extrínseco potencialmente implicado en resistencia a TFD, se aislaron y caracterizaron fibroblastos procedentes del estroma tumoral de biopsias de pacientes con CBC (superficiales, nodulares e invasivos). Éstos presentaron ciertas características de fibroblastos asociados a cáncer (CAFs), como una menor expresión de Vinculina y Endogлина, y, aunque variable, mayor de  $\alpha$ -SMA, MMP-1 y MMP-9. Los fibroblastos de CBCs superficiales y nodulares presentaron niveles superiores de especies reactivas de oxígeno, por lo que se evaluó la expresión de un panel de genes relacionados con estrés oxidativo, destacándose la alteración de *Hemoxygenasa-1*, *Uncoupling Protein 2* y genes de la síntesis de GSH. Finalmente, para valorar el papel potencial de los CAFs en la respuesta a TFD se realizaron co-cultivos de la línea CSZ con medio condicionado con fibroblastos control (MC) y con CAFs de CBC invasivo (MI). El MI no afectó a la respuesta a TFD de CSZ, pero inhibió la proliferación de P; mientras que el MC indujo resistencia en P y 10<sup>a</sup>G.

En conclusión, la resistencia a TFD-MAL en CBC se relaciona con la localización/producción de PpIX, la mayor presencia de CMCs, la activación/represión de la ruta Wnt/ $\beta$ -cat y la TEM -dependientes de p53-. Los CAFs no parecen condicionar la respuesta negativa a TFD en CBCs.

## Summary

---

Basal cell carcinoma (BCC) is the most prevalent skin cancer worldwide; appears in photoexposed areas and it is highly mutilating. One of its approved treatments is the photodynamic therapy (PDT), after which relapses may appear. Due to the scarce amount of research, the objective of this work was to study the mechanisms responsible for them. For the evaluation of possible intrinsic mechanisms 3 lines from murine BCCs (P) heterozygous for the gene *ptch* were used. The ASZ line expressed *p53* while BSZ and CSZ did not. From P cells, resistant to 10 cycles of PDT-MAL cells were generated (10<sup>a</sup>G), and after its inoculation in immunosuppressed mice P T and 10<sup>a</sup>G T were isolated. 10<sup>a</sup>G presented higher tumorigenic capacity. The photosensitizer protoporphyrin IX (PpIX) was located on the membrane of all lines, and also in the nucleus of ASZ and BSZ P; CSZ P produced more PpIX than its 10<sup>a</sup>G. All the 10<sup>a</sup>G and 10<sup>a</sup>G T populations showed fusiform morphology and a higher presence of cancer stem cells (CSCs). Furthermore, the evaluation of tumour progression proteins pointed to the acquisition of epidermal-to-mesenchymal transition (EMT) and the alteration of Wnt/ $\beta$ -catenin pathway dependents on p53 expression: ASZ showed a higher expression of N-cadherin and Gsk3 $\beta$  (repressor kinase of the pathway), while in BSZ and CSZ adhesion proteins (E-cadherin and  $\beta$ -catenin) and Gsk3 $\beta$  expression was decreased. As extrinsic factor potentially implicated in PDT, fibroblasts from tumor stroma of biopsies of patients with BCC (superficial, nodular and invasive) were isolated and characterized. They presented some characteristics of cancer associated fibroblasts (CAFs), like a lower expression of Vinculin and Endoglin, and although variable, higher expression of  $\alpha$ -SMA, MMP-1 y MMP-9. Superficial and nodular BCCs fibroblasts had superior levels of reactive oxygen species, because of this, the expression of a panel of oxidative stress related genes was evaluated, highlighting the alteration of *Hemeoxiganase-1*, *Uncoupling Protein 2* and GSH synthesis proteins. Finally, to evaluate the potential role of CAFs in the response to PDT, co-cultures of the CSZ line were made with conditioned medium of control fibroblasts (CM) and with BCC invasive CAFs (IM). The IM did not affect the response to PDT in CSZ, but inhibited proliferation in P; while CM induced resistance in P and 10<sup>a</sup>G.

In conclusion, BCC resistance to PDT-MAL is related to PpIX localization/production, higher presence of CSCs, Wnt/ $\beta$ -cat activation/repression and EMT -p53 dependents-. Apparently, CAFs do not seem to determine the negative response to PDT in BCCs.

# Índice

---

<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. La piel	1
1.2. Cáncer cutáneo no melanoma	2
1.2.1. Carcinoma basocelular	2
1.3. Tratamiento del cáncer cutáneo no melanoma	5
1.3.1. Terapia fotodinámica	6
1.3.1.1. Mecanismo de acción	6
1.3.1.2. Fotosensibilizadores	7
1.4. Resistencia a terapias	10
1.4.1. Mecanismos intracelulares de resistencia a terapias	11
1.4.1.1. Células madre del cáncer	11
1.4.1.2. Ruta Wnt/ $\beta$ -catenina	13
1.4.1.3. Transición epitelio-mesénquima	13
1.4.2. Mecanismos extrínsecos de resistencia: el estroma tumoral	15
1.4.2.1. Identificación de CAFs	16
1.4.2.2. Función de CAFs	16
1.4.2.3. Implicación de los CAFs en resistencia a terapias	18
1.4.3. Mecanismos de resistencia a TFD	18
<b>2. Objetivos</b>	<b>21</b>
<b>3. Materiales y Métodos</b>	<b>23</b>
3.1. Líneas celulares	23
3.1.1. Aislamiento de fibroblastos humanos asociados a CBC	23
3.2. Cultivos y mantenimiento de células	24
3.3. Anticuerpos	24
3.4. Terapia fotodinámica y generación de líneas resistentes de CBC	26
3.4.1. TFD con medio condicionado de fibroblastos	27
3.5. Ensayos de tumorigenicidad	27
3.5.1. Aislamiento de queratinocitos de CBC murino	28
3.6. Morfología de las células en cultivo	28
3.7. Tamaño, complejidad y ciclo celular	29
3.8. Supervivencia celular	29
3.9. Proliferación celular	29
3.10. Producción y localización subcelular de PpIX	30
3.11. Producción de ROS	30
3.12. Extracción de ARN, RT-PCR y análisis de expresión por <i>arrays</i>	30
3.13. Inmunofluorescencia	32



3.14. Electroforesis de proteínas y <i>Western Blot</i>	33
3.15. Análisis de la actividad de MMPs	33
3.16. Estudios histológicos	34
3.16.1. Tinción con Hematoxilina/Eosina (H/E) y con Rojo de Alizarina	34
3.16.2. Inmunohistoquímica	34
3.17. Microscopía y análisis estadísticos	35
<b>4. Resultados</b>	<b>37</b>
4.1. Resistencia de líneas de CBC murino a TFD	37
4.1.1. Obtención de líneas celulares resistentes	37
4.1.2. Características diferenciales de las poblaciones P y 10 <sup>a</sup> G	38
4.1.2.1. Aspectos morfológicos	38
4.1.2.2. Tamaño y complejidad celular	39
4.1.2.3. Capacidad de proliferación	40
4.1.2.4. Estudio del ciclo celular	41
4.1.2.5. Localización y producción de protoporfirina IX	42
4.1.2.6. Estudios <i>in vivo</i>	43
4.1.2.6.1. Capacidad tumorigénica de las líneas de CBC	43
4.1.2.6.2. Estudio histológico de los tumores murinos	45
4.1.2.6.3. Morfología de las células obtenidas a partir de tumores murinos	48
4.1.2.7. Confirmación genética	48
4.1.2.8. Evaluación de proteínas implicadas en progresión tumoral	50
4.1.2.8.1. E-cadherina	50
4.1.2.8.2. Proteínas de tipo mesenquimal	52
4.1.2.8.3. Proteínas de la ruta Wnt/ $\beta$ -catenina	55
4.1.2.9. Expresión de marcadores de células madre	58
4.1.2.9.1. Abcg2	58
4.1.2.9.2. Aldh1	60
4.1.2.9.3. Sox2	60
4.1.2.9.4. Oct4	62
4.1.2.9.5. Nanog	62
4.2. Estudio de fibroblastos asociados a distintos tipos de CBC	65
4.2.1. Análisis histológico e inmunohistoquímico de los CBCs	65
4.2.1.1. Expresión de marcadores relacionados con carcinogénesis	66
4.2.2. Caracterización de los fibroblastos procedentes de los CBCs	70
4.2.2.1. Valoración de la expresión de marcadores de CAFs	71
4.2.2.1.1. Vinculina	71
4.2.2.1.2. Vimentina	75
4.2.2.1.3. FAP-1	75
4.2.2.1.4. Endogлина	77

4.2.2.1.5. $\alpha$ -SMA	79
4.2.2.1.6. S100A4	79
4.2.2.1.7. Galectina-1	83
4.2.2.1.8. MMPs	84
4.2.3. Evaluación del estrés oxidativo en fibroblastos de CBCs	85
4.2.3.1. Producción de ROS	85
4.2.3.2. Estudio de genes relacionadas con estrés oxidativo	85
4.2.3.2.1. Hemooxigenasa-1	89
4.2.3.2.2. <i>Uncoupling Protein 2</i>	91
4.2.3.2.3. Glutación sintetasa	93
4.3. Efecto de los fibroblastos sobre la respuesta a TFD del CBC	95
4.3.1. Efecto sobre la proliferación y la respuesta a TFD	96
4.3.2. Concentración de proteína total	97
4.3.3. Actividad de MMPs	98
4.3.4. Expresión de proteínas de adhesión	98
<b>5. <u>Discusión</u></b>	<b>101</b>
5.1. Resistencia intrínseca a TFD en líneas de CBC murino	101
5.2. Evaluación de fibroblastos aislados de distintos tipos de CBC	109
5.3. Respuesta a TFD de la línea CSZ en co-cultivo indirecto	114
5.4. Limitaciones del estudio	115
<b>6. <u>Conclusiones</u></b>	<b>117</b>
<b>7. <u>Bibliografía</u></b>	<b>119</b>
<b>8. <u>Anexos</u></b>	<b>135</b>

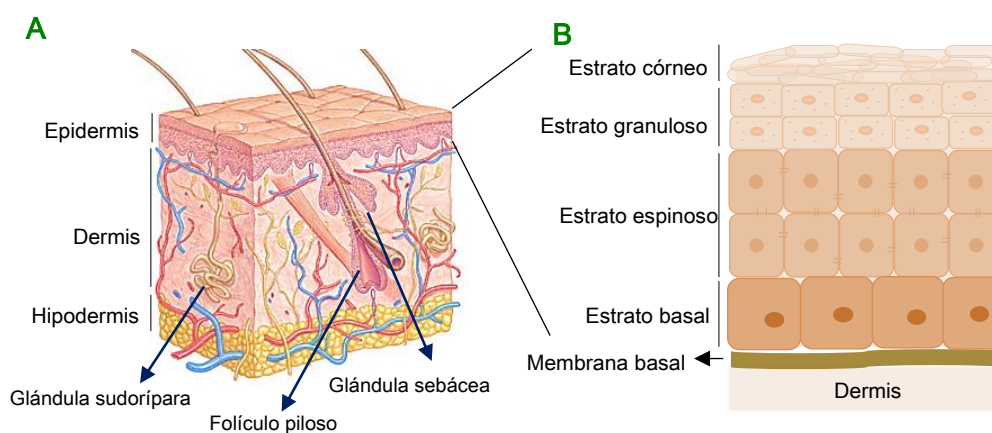


# Introducción

## 1.1. La piel

La piel es el órgano más extenso del cuerpo humano (1,5-2 m<sup>2</sup>) y posee diversas funciones: protectora, perceptiva y reguladora, entre otras. Se estructura en tres capas: epidermis, dermis e hipodermis. Además, presenta una serie de anejos asociados como son los folículos pilosos, las glándulas sebáceas y las glándulas sudoríparas (Gilaberte *et al.*, 2016)

La capa más superficial, la epidermis, es un epitelio estratificado queratinizado compuesto principalmente por queratinocitos (**Fig. 1**). Esta capa actúa de barrera contra agentes químicos y físicos, y patógenos; además, previene de la deshidratación. La epidermis se subdivide en diferentes estratos de acuerdo al estado de diferenciación de sus queratinocitos: basal o germinativo, espinoso, granuloso y córneo. Además de los queratinocitos, en esta capa se encuentran los melanocitos -implicados en la pigmentación-, las células de Merkel -relacionadas con la percepción sensorial- y las células de Langerhans -que forman parte del sistema inmune, son presentadoras de antígeno y suelen situarse en la capas suprabasales-. La epidermis experimenta un proceso constante de renovación durante el cual los queratinocitos proliferan en el estrato basal y avanzan hacia capas más superficiales a medida que se diferencian (Fuchs, 2016).



**Fig. 1 Estructura de la piel.** (A) La piel se compone de epidermis, dermis e hipodermis, y posee una serie de anejos asociados, como son los folículos pilosos, las glándulas sebáceas y las glándulas sudoríparas (Modificada de <http://emobiola.com/guia/guia/Piel.html>). (B) La epidermis está formada mayoritariamente por queratinocitos organizados en un epitelio estratificado queratinizado, el cual se subdivide en estrato córneo, granuloso, espinoso y germinativo o basal. La epidermis se ancla a la dermis a través de la membrana basal.

La epidermis se ancla a la dermis a través de una membrana basal. La dermis es una capa fina de tejido conectivo cuyo elemento celular principal es el fibroblasto. Estas células son responsables de la producción de colágeno y elastina que, en combinación con elementos no fibrosos, forman la matriz extracelular (MEC), la cual aporta elasticidad

y resistencia mecánica a la piel. Además de los fibroblastos, en la dermis podemos encontrar otros tipos celulares como son: los mastocitos -con gránulos de heparina e histamina-, los linfocitos -productores de anticuerpos-, y los macrófagos -células presentadoras de antígeno y con capacidad fagocítica-. En esta capa se encuentran los vasos sanguíneos. Por último, subyacente a la dermis, se localiza la hipodermis, que se compone principalmente de células adiposas que evitan la pérdida de calor. La hipodermis actúa de nexo entre la dermis y el resto de órganos corporales (Gilaberte *et al.*, 2016).

La piel, al estar en contacto con el ambiente, es susceptible de sufrir modificaciones por factores externos físicos, químicos o biológicos, destacando entre ellos la radiación ultravioleta (UV) procedente de la luz solar, que es la principal responsable del fotoenvejecimiento, de la hipo e hiperpigmentación y del cáncer cutáneo.

## 1.2. Cáncer cutáneo no melanoma

Según la *American Cancer Society*, el cáncer de piel es el tipo de cáncer más común a nivel mundial. Su alta incidencia se ha incrementado en los últimos 25 años en la población caucásica. El cáncer cutáneo puede clasificarse en dos tipos principales según su origen celular: el melanoma, que se desarrolla a partir de los melanocitos, y el cáncer cutáneo no melanoma (CCNM), que se origina a partir de los queratinocitos. A pesar de que el CCNM es el más frecuente, el melanoma es el más agresivo, siendo responsable del 1-2 % de las muertes por cáncer. Los casos de CCNM aumentan un 3-10 % cada año, incidiendo de forma especial en población caucásica de piel clara y que vive en regiones de alta exposición a la radiación UV. En este sentido, es destacable Australia, donde el 1-2 % de la población desarrolla un CCNM cada año (Patel *et al.*, 2011; Welsh *et al.*, 2011; Lomas *et al.*, 2012; Gordon, 2013; Qadir, 2016; Seebode *et al.*, 2016; Apalla *et al.*, 2017).

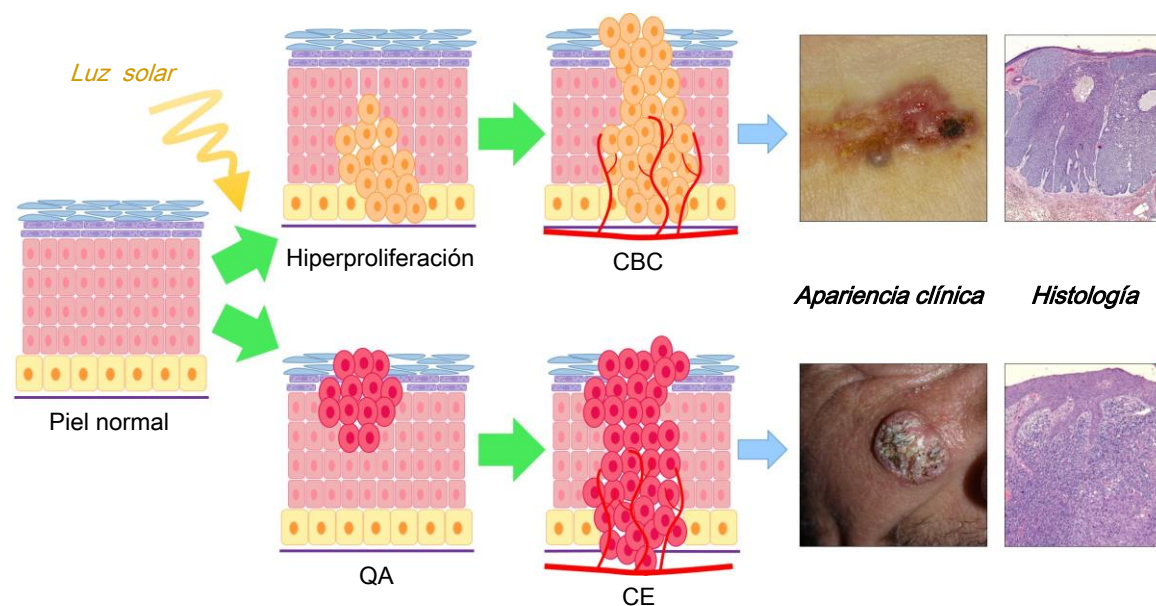
Los dos tipos de CCNM más comunes son el carcinoma escamoso (CE) y el carcinoma basocelular (CBC), cuyos orígenes son aún discutidos (**Fig. 2**). Se cree que el CE proviene de la proliferación descontrolada de queratinocitos del estrato espinoso de la epidermis y su estadio temprano es la queratosis actínica (QA). En cuanto al CBC, se considera una neoplasia cutánea que se desarrolla a partir de células madre (CM) de la capa basal de la epidermis o del epitelio folicular (Youssef *et al.*, 2010; Sellheyer, 2011; Wang *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2012; Grazzini y De Giorgi, 2015).

### 1.2.1. Carcinoma basocelular

El CBC, cuyo tratamiento es el objeto de esta tesis, es el tumor maligno más frecuente en el ser humano, representando el 80 % de los cánceres diagnosticados. Se trata de tumores de crecimiento lento y, dado que su principal agente carcinógeno es la radiación UV, en un 85 % de los casos aparecen en zonas fotoexpuestas, como la cara,



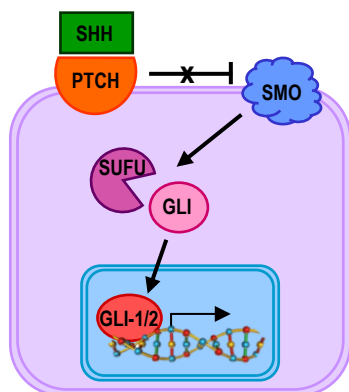
el cuello y el dorso de las manos. Su tasa de mortalidad es muy baja y rara vez metastatiza (0,0028-0,5 %), pero es altamente mutilante, destruyendo el tejido circundante (Patel *et al.*, 2011; Moan *et al.*, 2015; Qadir, 2016). Además, su tasa de recurrencia es elevada, aproximadamente en el 10-20 % de los pacientes el tumor vuelve a aparecer en un periodo de 5 años (Aguayo-Leiva *et al.*, 2010; Patel *et al.*, 2011). Por ello, a pesar de que se trata de un tumor con crecimiento local y poca capacidad metastásica, su alta incidencia hace que sea un problema de salud con unos costes anuales muy elevados; en concreto, en EEUU supone unos 1000 millones de dólares al año (Wu *et al.*, 2015).



**Fig. 2 Desarrollo del CCNM.** La piel normal sufre alteraciones por exposición a la luz UV. Si la célula alterada es un queratinocito de la capa basal, hiperprolifera y da lugar a un CBC. Si la hiperproliferación se produce a partir de queratinocitos del estrato espinoso, se origina una QA que eventualmente evoluciona a un CE (Modificado de Lucena *et al.*, 2015).

El CBC es una enfermedad compleja que puede manifestarse de forma espontánea o deberse a síndromes genéticos de predisposición -como son el síndrome de Gorlin-Goltz y el Xeroderma Pigmentoso-, pero en muchos casos se encuentra alterada la ruta de señalización *Hedgehog* (HH) (Jaju *et al.*, 2016; Shanley y McCormack, 2016). La acción reguladora de esta ruta está vinculada a la proteína *Sonic Hedgehog* (SHH), un ligando del complejo de receptores de membrana *Patched* (PTCH) y del correceptor *Smoothened* (SMO). En concreto, PTCH-1 es el miembro principal de la familia PTCH y es clave en el desarrollo embrionario y tumorigénesis. En ausencia de PTCH (Fig. 3), SMO se encuentra permanentemente activado, inhibiendo al factor de transcripción GLI (*Glioma-associated oncogene homologue*). Este último es una familia de factores de transcripción dependientes de  $Zn^{2+}$  (GLI-1, GLI-2 y GLI-3) que actúa como un protooncogén asociado a glioma. Cuando SHH se une a PTCH, se retira la supresión de SMO, lo que promueve la disociación de la proteína quinasa SUFU (Supresor de *Fused*), que se encuentra asociada a microtúbulos y a GLI, que queda liberado en el citoplasma.

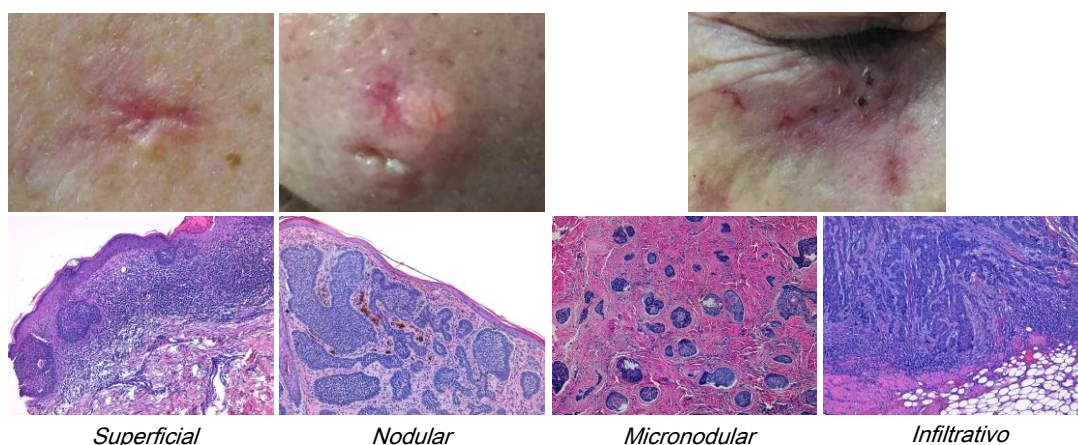
Esto permite la activación y translocación al núcleo de GLI-1 y GLI-2 y la degradación de GLI-3, la forma represora, con un resultado final de proliferación, apoptosis y diferenciación epidérmica (Choudhry *et al.*, 2014).



**Fig. 3 Ruta de señalización HH.** Cuando SHH se une a PTCH, se libera SMO. Esto promueve la disociación de SUFU de GLI. Entonces, se degrada la forma represora GLI-3, y se activan y translocan al núcleo GLI-1 y GLI-2 para actuar de factores de transcripción y como resultado dan lugar a proliferación, apoptosis y diferenciación epidérmica.

Las mutaciones que activan constitutivamente la vía HH parecen ser las implicadas en el desarrollo de los CBCs esporádicos provocados por exposición a la luz UV. En un 50-70 % de los casos ocurre por inactivación de PTCH-1, en un 20 % por la de SMO y en un 1 % por la de SUFU. La pérdida de heterocigosis de PTCH también es característica del síndrome de Gorlin-Goltz (Toftgård, 2000; Choudhry *et al.*, 2014).

Existen distintas clasificaciones de los tipos de CBC en humanos, pero, en general, se asume una primera división entre los de crecimiento indolente y los de crecimiento agresivo. Los de crecimiento indolente incluyen los superficiales y los nodulares. El subconjunto de los agresivos engloba a los infiltrativos, los metatípicos y los morfeiformes o esclerosantes (Crowson, 2006; Di Stefani y Chimenti, 2015; Marzuka y Book, 2015). A continuación se desarrollan los subtipos más relevantes para este estudio (Fig. 4).



**Fig. 4 Apariencia clínica e histología de diferentes tipos de CBC.** Se muestran la apariencia clínica y la histología de distintos tipos de CBC. Los subtipos agresivos, micronodular e infiltrativo, muestran una apariencia clínica similar (Imágenes cedidas por la Dra. Fernández Guarino y la Dra. Gracia-Cazaña).

El **CBC superficial** es el segundo tipo de CBC más común, representando más del 15 % de los casos. Aparece en el tronco y las extremidades y aparece a edades más

tempranas que el resto de tipos. Es una lesión rosa-rojiza, en forma de placa, con límites bien definidos. Está caracterizado por la proliferación atípica de células basales que forman un eje paralelo a la superficie de la epidermis, y penetra hasta la dermis. Muestra una retracción en forma de hendidura de las células basales en empalizada que se separan del estroma subyacente. Las células tumorales pueden colonizar el folículo piloso.

El **CBC nodular** es el más común (50-79 % de los CBCs). Predomina en la cabeza, especialmente en las mejillas, los pliegues nasolabiales, la frente y los párpados. Está caracterizado por la presencia de nidos grandes de células basales en la dermis, acompañados de retracción peritumoral, con fibroblastos de morfología normal. El estroma puede mostrar calcificación en algunas islas del tumor. Como hay retracción, los nidos pueden desprenderse del estroma y dejar huecos vacíos en la dermis, lo que le distingue de los infiltrativos. Pueden mostrar además morfologías superficiales y/o micronodulares, y pueden evolucionar a formas más agresivas.

El **CBC micronodular** es una lesión endurecida en forma de placa y pobremente delimitada. Tiene una alta recurrencia. Muestra los mismos nidos redondeados que las lesiones nodulares, pero son más pequeños y presentan una distribución asimétrica, introduciéndose en la dermis o incluso a nivel subcutáneo. El estroma en este tipo de CBC está en proliferación. Los espacios debidos a la retracción no son comunes y se cree que podrían ser un paso intermedio entre nodular y los subtipos más agresivos.

El **CBC infiltrativo** tiene una forma irregular y nidos con ángulos afilados de distintos tamaños. El estroma se encuentra en proliferación, es fibrótico con haces densos de colágeno, y aparecen fibroblastos ensanchados. Este tipo de CBC puede invadir capas subcutáneas y el músculo adyacente.

### 1.3. Tratamiento del cáncer cutáneo no melanoma

---

Existen diferentes tratamientos para el CCNM que buscan en su conjunto, además de su curación, preservar en la medida de lo posible el tejido sano circundante y obtener unos resultados cosméticos óptimos (Micali *et al.*, 2013; Haque *et al.*, 2015; Lanoue y Goldenberg, 2016; Amaral y Garbe, 2017). En general, se podrían clasificar en: invasivos o de tipo quirúrgico y no invasivos. La radioterapia, la criocirugía, la quimioterapia tópica o sistémica y la escisión quirúrgica son los más empleados. Los tratamientos tópicos más utilizados incluyen el 5-fluorouracilo (5-FU) -un antimetabolito que reduce la síntesis de ADN y ARN-, Imiquimod -un modulador de la respuesta inmune-, Diclofenaco -que inhibe principalmente a la ciclooxygenasa 2 (COX-2)-, y el Ingenol mebutato -que induce la muerte celular por necrosis-. A nivel sistémico se emplean el Vismodegib -un inhibidor de la ruta de HH-, y Cetuximab -anticuerpo inhibidor de EGFR (*Epidermal Growth Factor*

Receptor)-, entre otros. Dentro de los tratamientos no invasivos, destaca la terapia fotodinámica (TFD). La elección del tratamiento depende de la edad del paciente y su estado de salud; deberá adecuarse al tipo histológico de la lesión, tamaño, localización y nivel de agresividad (Neville *et al.*, 2007; Wiznia y Federman, 2016; Amaral y Garbe, 2017).

### 1.3.1. Terapia fotodinámica

Aunque las propiedades terapéuticas de la luz son conocidas desde hace miles de años, hasta el siglo XX no se desarrollaron verdaderamente terapias basadas en su uso, como la TFD. Está aprobada en clínica para el tratamiento de determinados tipos de cáncer, lesiones precancerosas y diversas enfermedades dermatológicas no oncológicas. La TFD basa su acción en la combinación de tres componentes básicos que no son tóxicos *per se*: un compuesto fotosensibilizador (FS), luz de adecuada longitud de onda y oxígeno molecular (O<sub>2</sub>). El FS se activa con la luz y, en presencia de O<sub>2</sub>, da lugar a una reacción fotoquímica que genera especies reactivas de oxígeno (ROS, *Reactive Oxygen Species*), las cuales son responsables de la destrucción de los tejidos. La TFD también tiene efectos indirectos debido a su acción sobre el estroma del tumor -MEC, vasculatura y componentes celulares como fibroblastos, células del sistema inmune-. La eficacia del tratamiento depende del tipo de lesión, del FS, del tiempo de irradiación y de la concentración de O<sub>2</sub> en el tejido (Dougherty *et al.*, 1998; Juarranz *et al.*, 2008; Agostinis *et al.*, 2011; Allison y Moghissi, 2013; van Straten *et al.*, 2017).

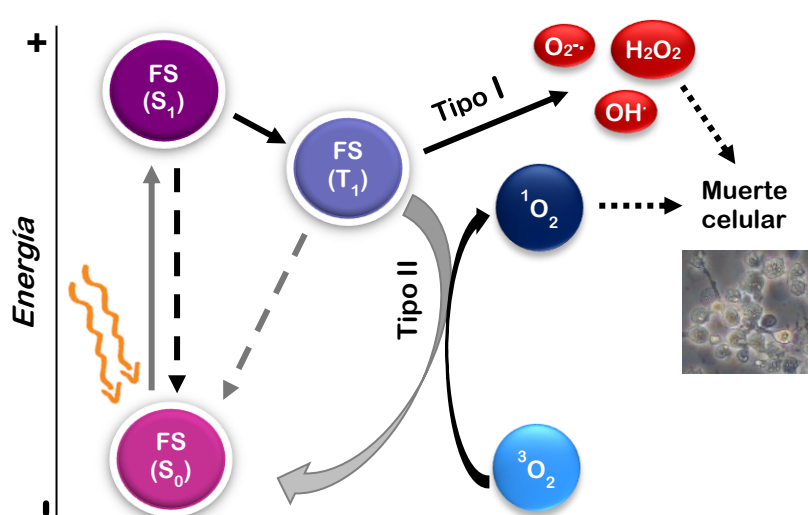
Esta terapia presenta numerosas ventajas frente a otros tratamientos: puede combinarse con otras terapias -como la cirugía, la quimioterapia o la radioterapia-, es mínimamente invasiva, tiene excelentes resultados cosméticos, es muy selectiva y, por tanto, respeta el tejido sano circundante, y es rápida, ambulatoria y no tóxica (Dąbrowski y Arnaut, 2015; Lucena *et al.*, 2015; Savoia *et al.*, 2015).

Actualmente, la TFD es ampliamente utilizada en el campo de la dermatología, principalmente para el tratamiento de lesiones precancerosas (QA) y ciertos tipos de CCNM (CBC y CE *in situ*) (Braathen *et al.*, 2012; Wan y Lin, 2014; Griffin y Lear, 2016). Asimismo, también es aplicada como tratamiento para lesiones no oncológicas -como la psoriasis y el acné- y, debido a sus propiedades antifúngicas y antibacterianas, por ejemplo, contra el *Staphylococcus aureus* (Oniszczuk *et al.*, 2016; Gilaberte *et al.*, 2017).

#### 1.3.1.1. Mecanismo de acción

El FS, una vez administrado, tiende a acumularse preferentemente en las células tumorales. A continuación, la zona a tratar es irradiada con luz de longitud de onda adecuada al espectro de absorción del FS. El FS irradiado pasa de su estado fundamental

( $S_0$ ) a un estado electrónicamente excitado ( $S_1$ ) muy inestable (**Fig. 5**). La caída del  $S_1$  al estado  $S_0$  puede ser directa (emisión de luz) o indirecta pasando por un estado más estable de triplete excitado ( $T_1$ ) y emitiendo fluorescencia. Es en el estado  $T_1$  en el que puede interaccionar con su entorno mediante reacciones fotoquímicas tipo I o tipo II. En las reacciones tipo I, el FS reacciona con biomoléculas de su entorno cercano (ADN, proteínas, lípidos) y forma radicales libres, que al interaccionar con el  $O_2$ , generarán ROS (anión superóxido, peróxido de hidrógeno, o radical hidroxilo). En las reacciones tipo II, transfiere su energía directamente al  $O_2$ , dando lugar al oxígeno singlete ( $^1O_2$ ). La reacción de tipo II predomina en ambientes ricos en  $O_2$  mientras que la de tipo I en ambiente hipóxicos (Plaetzer *et al.*, 2009; Bacellar *et al.*, 2015; Nonell *et al.*, 2015).



**Fig. 5 Mecanismo de acción de la TFD.** Cuando un FS es excitado con luz de adecuada longitud de onda, pasa de su estado basal  $S_0$  a un estado excitado  $S_1$ . Éste, en su caída al estado fundamental pasa a un estado triplete  $T_1$  más estable. En el estado  $T_1$  puede interaccionar mediante reacciones tipo I con biomoléculas dando lugar a  $H_2O_2$ ,  $O_2^{\bullet-}$  y  $OH^{\bullet}$ ; o reacciones tipo II reaccionando con el oxígeno triplete y dando lugar al oxígeno singlete. En último término, las ROS producen la muerte celular.

De las ROS generadas en estos procesos, el  $^1O_2$  es el principal responsable de la muerte celular por TFD. Su vida media es muy corta, de aproximadamente 40 ns y ejerce su acción en un radio limitado de 20 nm. Este hecho explica que el daño principal de la TFD sea localizado y se limite al área dónde se encuentra el FS (Juarranz *et al.*, 2008; Agostinis *et al.*, 2011; Allison y Moghissi, 2013; van Straten *et al.*, 2017).

### 1.3.1.2. Fotosensibilizadores

El primer FS empleado para TFD en clínica fue la hematoporfirina (Hp), caracterizado por Meyer-Betz a comienzos del siglo XX. Más tarde, Lipson y Schwartz obtuvieron un derivado de la hematoporfirina (HpD), el cual era una mezcla de porfirinas, que emplearon para la detección del tejido tumoral. En los años 70 y 80, el grupo de Dougherty, describió la regresión de tumores mamarios en ratas y ratones cuando eran tratados con HpD y luz roja. Dougherty, que contribuyó al desarrollo de los ensayos



clínicos, fundó en 1986 la Asociación Internacional de Fotodinámica. En 1978, a partir de la purificación del HpD, se desarrolló el Photofrin®, el FS más usado en TFD clínica y aprobado en Canadá desde 1993 para su uso en el tratamiento de cánceres gástricos, de esófago, pulmón y vejiga. A pesar de ello, el Photofrin® tiene numerosos inconvenientes, destacando su prolongada fototoxicidad y su escasa absorción en la región del espectro correspondiente al rojo, la cual posee la mayor capacidad de penetración en la piel (Dougherty *et al.*, 1998).

A la Hp y sus derivados, considerados FS de primera generación, les sigue una segunda generación de compuestos que incluye clorinas (Temoporfin, Foscan®; Bremachlorin®), ftalocianinas, porfírenos y precursores de FS porfirínicos como el ácido 5-aminolevulínico (ALA, Levulan®) y su éster metílico MAL (Metvix®) (Abrahamse y Hamblin, 2016; Lange y Bednarski, 2016). Cuatro compuestos con nombre registrado (Photofrin®, Foscan®, Levulan® y Metvix®) han sido aprobados por la Agencia Europea del Medicamento con diferentes aplicaciones en el campo de la oncología (Lange y Bednarski, 2016; van Straten *et al.*, 2017).

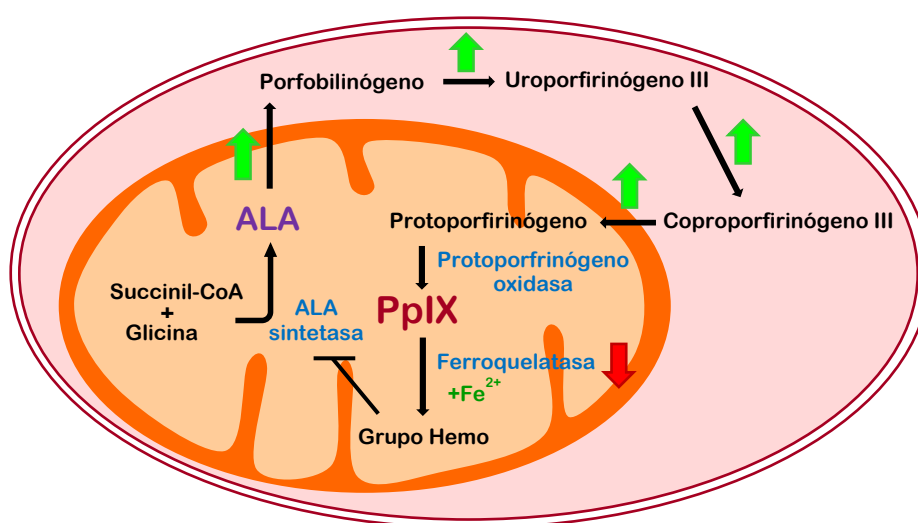
No obstante, un área importante de investigación es la búsqueda del FS ideal para el tratamiento contra el cáncer, que debería tener las siguientes propiedades: absorber luz de longitud de onda comprendida entre 600 y 800 nm, ser un compuesto puro y estable, producir cantidad suficiente de ROS una vez irradiado, no ser tóxico *per se* y eliminarse rápidamente de los tejidos sanos para minimizar los efectos secundarios de la TFD (Juarranz *et al.*, 2008; Agostinis *et al.*, 2011; Abrahamse y Hamblin, 2016).

La penetración de la luz en el tejido se ve aumentada con su longitud de onda. Por ello, la luz roja (625-640 nm) es la más empleada en TFD, dado que, aunque es menos energética que la azul (450-495 nm), penetra más profundamente en los tejidos biológicos. No obstante, en TFD no se suele emplear luz de longitud de onda superior a 800 nm, ya que no tiene la suficiente energía para iniciar una reacción fotodinámica (Plaetzer *et al.*, 2009; Agostinis *et al.*, 2011).

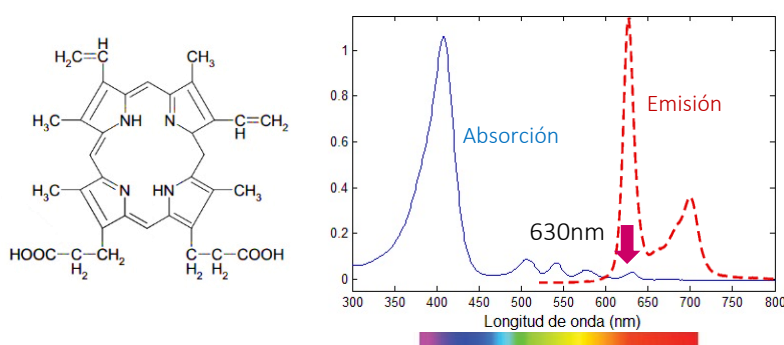
En el ámbito de la oncología dermatológica, los compuestos más empleados actualmente son el ALA y el MAL. Éstos no son FS en sí mismos si no que son precursores del FS endógeno protoporfirina IX (PpIX), metabolito intermediario de la ruta de biosíntesis del grupo hemo (Kennedy *et al.*, 1990; Agostinis *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2015).

La ruta de biosíntesis del grupo hemo transcurre en la mitocondria y el citoplasma (Fig. 6). Se inicia con la síntesis de ALA a partir de glicina y succinil-CoA, catalizada por la enzima ALA sintetasa. En sucesivos pasos se van formando los intermediarios porfobilinógeno, uroporfirinógeno III, coproporfirinógeno III y protoporfirinógeno. En este punto, la enzima protoporfirinógeno oxidasa convierte este último compuesto en PpIX y la ferroquelatasa introduce un ion ferroso en el anillo para dar lugar así al grupo hemo. La

síntesis de ALA está estrictamente regulada por un mecanismo de retroalimentación negativa. De esta manera, la administración exógena de ALA o sus derivados evita dicho control y origina la acumulación temporal de los intermediarios. En las células tumorales esta acumulación es mayor debido al desajuste de la actividad de las enzimas implicadas, como la ferroquelatasa, que se encuentra disminuida, y las enzimas pre-PpIX que están aumentadas, y por tanto acumulándose PpIX. Además, determinadas características del tejido tumoral, como su elevada permeabilidad vascular, favorecen la acumulación del FS. La PpIX presenta varios picos de absorción en el espectro visible, destacando el situado en la región del espectro del rojo a 630 nm (**Fig. 7**) (Juarranz *et al.*, 2008; Agostinis *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2015).



**Fig. 6 Ruta de biosíntesis del grupo hemo.** El ALA es primer intermediario de la ruta de biosíntesis del grupo hemo. A través de diferentes reacciones enzimáticas, en la mitocondria y el citosol, tiene lugar la formación de la PpIX. En una célula cancerígena, las enzimas previas a la PpIX están aumentadas y la ferroquelatasa está disminuida, lo que favorece la acumulación de PpIX tras la administración exógena de ALA.



**Fig. 7 Protoporfirina IX.** En la figura se muestran la molécula de la PpIX y sus espectros de absorción y emisión de fluorescencia. La PpIX tiene distintos picos de absorción, siendo el de mayor penetración el de 630 nm. Tiene dos picos de emisión de fluorescencia, a 635 nm y a 700 nm.

De las formulaciones aprobadas del ALA, en EEUU, el Levulan®, únicamente está aprobado para el tratamiento en combinación con luz azul de QAs hipertróficas. En Europa, además de éste, están aprobados un parche, Alacare®, y un gel, Ameluz®, para el tratamiento en combinación con luz roja de QAs (Wan y Lin, 2014).

Un inconveniente del ALA es su difícil penetración en la piel debido a su carácter hidrofílico, lo que limita su aplicación a lesiones superficiales (Wan y Lin, 2014). En este sentido, se desarrolló el MAL, un derivado del ALA, que posee carácter lipofílico, lo que le confiere una mayor capacidad de penetración a través de las membranas celulares. El MAL se hidroliza inmediatamente después de su entrada en la célula, transformándose en ALA y siguiendo los pasos de la síntesis del grupo hemo descritos anteriormente (Ericson *et al.*, 2008; Wan y Lin, 2014). En la actualidad, en EEUU, el MAL (Metvixia®) está aprobado para el tratamiento de QAs no hiperqueratósicas de cabeza y cara en pacientes inmunocompetentes. En Europa, Nueva Zelanda y Australia además está aprobado para CBC superficial y nodular; y para CE *in situ* sólo en Europa (Morton *et al.*, 2002; Siddiqui *et al.*, 2004; Lee y Kloser, 2013; Wan y Lin, 2014).

#### 1.4. Resistencia a terapias

---

Un alto porcentaje de los tumores desarrollan resistencia a terapias, lo que justifica la necesidad de investigar el proceso y de buscar tratamientos que permitan evitarla. La resistencia contribuye a la progresión tumoral, se relaciona con el mal pronóstico clínico y, en último término, es responsable de las recidivas. Aunque no se conoce totalmente el fenómeno, el proceso de resistencia ha sido muy estudiado en quimioterapia y radioterapia (Holohan *et al.*, 2013; Rebucci y Michiels, 2013; Al-Dimassi *et al.*, 2014; Housman *et al.*, 2014; Esmatabadi *et al.*, 2016; Frączek *et al.*, 2016); sin embargo, está escasamente analizado en el caso de la TFD (Olsen *et al.*, 2013; Gilaberte *et al.*, 2014; Bardazzi *et al.*, 2015; Gracia-Cazaña *et al.*, 2016).

Las causas del fenómeno de resistencia se pueden clasificar en innatas y adquiridas. Las innatas se deben a alteraciones intrínsecas al paciente que existían previamente al tratamiento y que permiten a las células tumorales escapar de la muerte celular. Las adquiridas son las producidas por el propio tratamiento. A nivel intracelular, los mecanismos de resistencia son numerosos, destacando: dosis insuficiente de fármaco o de radiación, inactivación o expulsión de la droga y alteraciones en las propias células (mutaciones, cambios metabólicos) que pueden llevar a inhibición de la reparación del ADN y/o de la muerte celular. Además, las alteraciones en el estroma o microambiente tumoral pueden favorecer, por ejemplo, el proceso de transición epitelio-mesénquima (TEM). Estos mecanismos pueden transformar en más agresivas a las células tumorales (Wu *et al.*, 2014; Ramos y Bentires-Alj, 2015; Pan *et al.*, 2016). La alta heterogeneidad celular de los tumores explica la distinta predisposición de las células a ser sensibles o resistentes a un tratamiento (Saunders *et al.*, 2012). A continuación se describen brevemente dichos procesos, señalando de forma específica los avances en el caso de la TFD.

### 1.4.1. Mecanismos intracelulares de resistencia a terapias

Aunque muchos tipos de cáncer son inicialmente susceptibles a los tratamientos, con el tiempo pueden desarrollar estrategias de resistencia a las mismas. Los mecanismos por los que las células tumorales son resistentes a la TFD tienen similitudes con los implicados en la resistencia a drogas en general (Rapozzi y Jori, 2015). Se indican a continuación algunos de los mecanismos intracelulares involucrados en resistencia a drogas general y se desarrollan más ampliamente aquellos que serán objeto de este estudio.

Existen mecanismos que conllevan una disminución de la efectividad de la droga, que incluyen su inactivación al interaccionar con moléculas biológicas que la modifican o que activan el sistema de detoxificación o cambios en proteínas relacionadas con la muerte celular por apoptosis, como P53. Asimismo, las células resistentes son capaces de expulsar la droga mediante transportadores de membrana tipo MDR/ABC (*Multidrug Resistance/ATP-Binding Cassette*) (Holohan *et al.*, 2013; Housman *et al.*, 2014; Esmatabadi *et al.*, 2016).

Otras estrategias de protección de las células cancerígenas frente a terapias se relacionan con inhibición de la muerte celular mediante la sobreexpresión de proteínas antiapoptóticas tipo BCL-2 (*B-Cell Lymphoma-2*) o PKB (Proteína quinasa B), la alteración de la reparación del daño al ADN inducido por drogas para evitar apoptosis o la modificación de la diana mediante mutaciones, lo que disminuye el efecto del tratamiento (Holohan *et al.*, 2013; Housman *et al.*, 2014).

A continuación, se abordarán más ampliamente otros tres mecanismos implicados en resistencia, por su relación con este trabajo. Éstos son: las células madre del cáncer (CMCs), a las cuales se las considera responsables de la metástasis y la recidiva, cuando aparentemente el tratamiento había sido efectivo (Cojoc *et al.*, 2015); la ruta Wnt/ $\beta$ -catenina ( $\beta$ -cat), que aparece activada constitutivamente en la mayoría de tumores sólidos y se ha demostrado que su inhibición permite superar la resistencia a terapias (Won *et al.*, 2016; Xue *et al.*, 2016; Shang *et al.*, 2017); y la TEM, proceso que conecta entre sí las rutas de señalización responsables de la metástasis, vascularización, generación de CMCs y la resistencia a terapias (Li y Li, 2015; Nantajit *et al.*, 2015).

#### 1.4.1.1. Células madre de cáncer

Los tumores son muy heterogéneos, inestables y plásticos genéticamente, lo que representa un reto para las terapias (De Sousa E Melo *et al.*, 2013). Se postula que los tumores tienen su origen en una única célula clonogénica que ha acumulado numerosas mutaciones genéticas o que se desarrollan a partir de diversos clones genéticamente

diferentes. Dada esta variabilidad, cada clon podría mostrar distintos mecanismos de resistencia a terapias (Cojoc *et al.*, 2015).

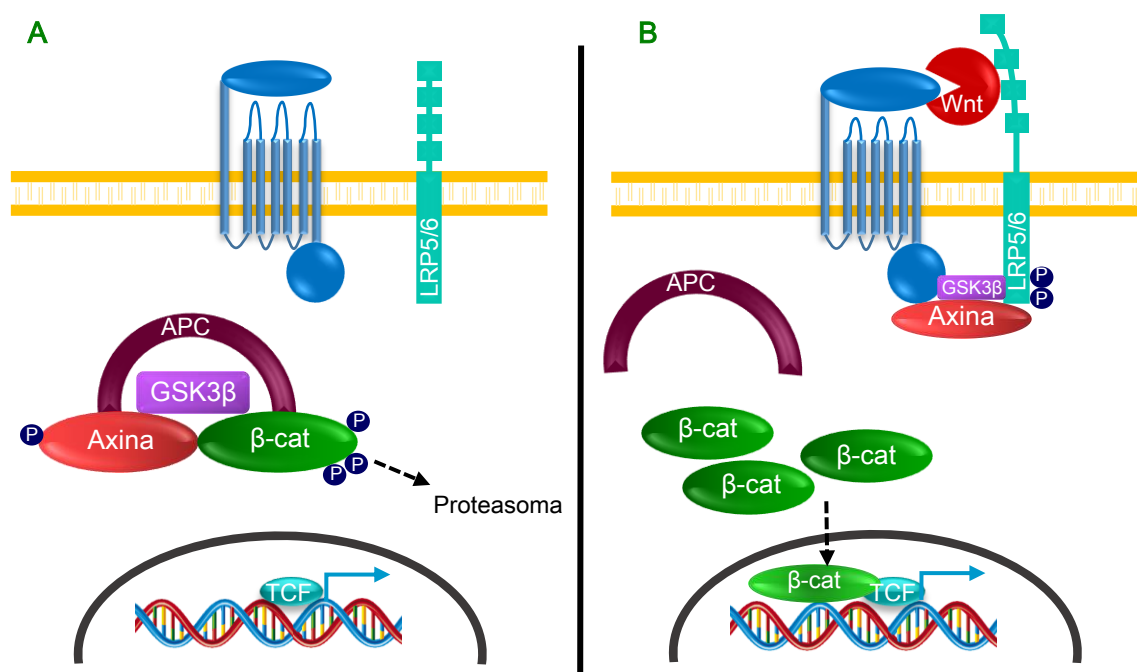
Las CMCs se definen en base a su capacidad de formar tumores en estudios de xenotransplantes. Representan una población minoritaria del tumor que puede ser identificada y aislada del resto del tejido gracias a marcadores específicos de membrana como: CD133, CD44, Lgr5 (*Leucine Rich Repeat Containing G Protein-Coupled Receptor 5*), Sox2 (*Sex determining Region Y-box 2*), Nanog y Oct4 (*Octamer-Binding Transcription Factor 4*) (Hadjimichael *et al.*, 2015; Abbaszadegan *et al.*, 2017). Estos marcadores son específicos de tejido o incluso del subtipo de tumor. En el caso del CBC, los estudios de búsqueda de marcadores específicos de CMCs son escasos, por lo que no existen conclusiones claras al respecto (Sellheyer, 2011). Las CMCs presentan, al igual que las CM de tejido, capacidad de autorenovación y potencial de repoblación a largo plazo. Cambios en diversas rutas de señalización les confieren adaptación a diversos tipos de estrés del microambiente como la inflamación, hipoxia, bajo pH, bajo nivel de nutrientes y terapias anti-cáncer. Estas células podrían ser las responsables de la recurrencia y de la progresión tumoral. Se ha relacionado a las CMCs con la TEM, que sucede durante la invasión de las células tumorales; cuando la TEM es inducida se promueve la adquisición de propiedades de CMCs (Visvader y Lindeman, 2008; Yu *et al.*, 2012; Colak y Medema, 2014; Cojoc *et al.*, 2015).

Existen distintos mecanismos de resistencia a terapia relacionados con las CMCs. Algunos de ellos son los asociados a la alta expresión de proteínas de la familia tipo MDR (MDR1, ABCG2/BCRP (*Breast Cancer Resistance Protein*)) o la alta actividad enzimática de las proteínas de la familia ALDH (Aldehído deshidrogenasa) en estas células. En especial, la ALDH1 y ALDH3A1 juegan un papel importante en la respuesta celular al estrés oxidativo, debido a su actividad en la neutralización de los radicales libres generados durante, por ejemplo, la radioterapia y/o a la producción de antioxidantes. La resistencia a terapia inducida por CMCs se puede atribuir también a la activación de rutas de señalización esenciales para la homeostasis tisular (Wnt, HH). Asimismo, se ha demostrado que un gran número de factores de crecimiento producidos por células mesenquimales del cáncer, fibroblastos asociados a cáncer (CAFs, *Cancer Associated Fibroblasts*) y células inmunes, afectan a las propiedades de las CMCs (Cojoc *et al.*, 2015; Abbaszadegan *et al.*, 2017). Otro mecanismo de resistencia de estas células consiste en su protección frente al daño mediante la regulación del ciclo celular, el incremento de actividad de los mecanismos de reparación y la retirada eficiente de las ROS (Agathocleous y Harris, 2013). Además, las CMCs usan vías alternativas para obtener más energía, como la autofagia. Estas células están en un estado indiferenciado y tienen una capacidad proliferativa menor a la de los tejidos normales, lo que les ayuda a escapar

a las terapias anti-cáncer, cuya diana principal son las células con una alta proliferación (Colak y Medema, 2014; Cojoc *et al.*, 2015).

#### 1.4.1.2. Ruta Wnt/ $\beta$ -catenina

En la vía de señalización Wnt/ $\beta$ -cat la entrada de  $\beta$ -cat citoplasmática en el núcleo modula la transcripción de diversos genes. Cuando la vía está inactiva (**Fig. 8**),  $\beta$ -cat es destruida vía proteasoma por un complejo constituido, entre otros elementos, por proteínas de “scaffold”, Axina y APC (*Adenomatous polyposis coli*), y las quinasas GSK3 $\beta$  (Glucógeno sintasa quinasa 3 $\beta$ ) y CDK1 $\alpha$  (Quinasa dependiente de ciclina 1 $\alpha$ ). Cuando Wnt se une a los receptores de membrana, se retira APC del complejo y el resto de componentes se relocalizan en la membrana. Esto permite la estabilización de  $\beta$ -cat y su entrada en el núcleo, promoviendo la expresión de genes diana, como la Ciclina D1, la cual regula la transición G1/S (Song *et al.*, 2015; Qie y Diehl, 2016). Esta vía está activada de forma constitutiva en la mayoría de los tumores sólidos debido, por ejemplo, a mutaciones en los genes implicados, que impiden la fosforilación de  $\beta$ -cat y por tanto su degradación (Saito-Diaz *et al.*, 2013; McCubrey *et al.*, 2016; Shang *et al.*, 2017).



**Fig. 8 Ruta de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina.** (A) En el estado inactivo de la ruta, la  $\beta$ -cat es fosforilada para ser degradada en el proteasoma por un complejo formado por APC, Axina y GSK3 $\beta$ . (B) Cuando Wnt se une al receptor, recluta a GSK3 $\beta$  y Axina al complejo de membrana, permitiendo que  $\beta$ -cat no sea fosforilada y entre al núcleo donde actúa de factor de transcripción (Modificado de Saito-Diaz *et al.*, 2013).

#### 1.4.1.3. Transición epitelio-mesénquima

En un epitelio, las células están fuertemente adheridas unas a otras por estructuras de adhesión tales como uniones estrechas, adherentes y tipo gap. En condiciones



normales, las células epiteliales se pueden desplazar dentro de una misma capa, por ejemplo en la epidermis, pero no son capaces de soltarse y desplazarse lejos del tejido. Por el contrario, las células mesenquimales no forman capas organizadas y muestran gran capacidad migratoria. Se denomina TEM al proceso que conlleva la pérdida por parte de las células epiteliales de las uniones intercelulares, a su separación y a la adquisición de características mesenquimales (Lee *et al.*, 2006; Guarino, 2007; Nakamura y Tokura, 2011). Una célula que sufre TEM presenta diversas características: modificación de su morfología, de una poligonal a una en forma de huso; reorganización del citoesqueleto de actina para favorecer la motilidad; cambio de marcadores de diferenciación de proteínas de adhesión célula-célula, como E-cadherina (E-cad), por proteínas mesenquimales, como vimentina o N-cadherina (N-cad)-; segregación de enzimas que degradan la MEC, como las metaloproteinasas (MMPs); regulación positiva y/o translocación nuclear de factores de transcripción como la  $\beta$ -cat o miembros de la familia Snail. El factor Snail es regulado negativamente por GSK3 $\beta$ , promoviendo su salida del núcleo y su degradación citoplasmática (Nakamura y Tokura, 2011; McCubrey *et al.*, 2014).

La TEM es un proceso reversible que se sustenta en cambios moleculares transitorios inducidos por elementos extracelulares, incluyendo los componentes de la MEC o la hipoxia, y no por cambios genéticos permanentes. En cáncer, la TEM es mantenida de forma prolongada mediante ligandos extracelulares del microambiente cercano, como EGF (*Epidermal Growth Factor*), FGF (*Fibroblast Growth Factor*) o miembros de la familia TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor- $\beta$* ), los cuales activan vías de señalización oncogénicas. En la progresión del cáncer, los tumores que disparan el programa de TEM se asocian a un mal pronóstico (Thiery y Sleeman, 2006; Li y Li, 2015).

Mediante la TEM, además, las células sufren reprogramación metabólica, adquiriendo un fenotipo más glicolítico, mientras que las células normales emplean preferentemente la fosforilación oxidativa mitocondrial. A este cambio de metabolismo se le denomina efecto Warburg, y permite a las células tumorales obtener suficiente energía y precursores biosintéticos, mantener un estado redox equilibrado y mantener un estado indiferenciado (Li y Li, 2015; Bhattacharya *et al.*, 2016).

Las características típicas de las células que han sufrido TEM son las propias de las CMCs, por lo que éstas podrían ser células epiteliales desdiferenciadas (Li y Li, 2015).

La relación de la TEM con la resistencia a quimioterapéuticos, como 5-FU o cisplatino, y a radioterapia ha sido ampliamente estudiada en multitud de cánceres (Nantajit *et al.*, 2015). Su implicación en resistencia se debe principalmente a la generación de CMCs, la sobreexpresión de transportadores MDR inducida por Snail, la activación de rutas oncogénicas como PI3K (Fosfatidil inositol-3 quinasa)/PKB/mTOR (*mammalian Target of Rapamycin*) o RAS, o la supresión de la muerte celular por factores

como NF- $\kappa$ B (Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas) (Saxena *et al.*, 2011; Nantajit *et al.*, 2015).

### 1.4.2. Mecanismos extrínsecos de resistencia: el estroma tumoral

Los tumores, incluido el CBC, no están únicamente compuesto por las células neoplásicas, sino que, además, presentan componentes estromales que modulan su comportamiento. Se engloba dentro de estroma o microambiente tumoral a la membrana basal, las células inmunes, los capilares, los fibroblastos y la MEC que circunda al tumor (Kalluri y Zeisberg, 2006; Hanahan y Weinberg, 2011; Kalluri, 2016). van Scott y Reinertson (1961) demostraron, mediante un experimento de autotransplante de un CBC en humanos, con y sin su estroma, que sólo el que era trasplantado con su estroma era capaz de implantarse y proliferar.

Los fibroblastos son el componente celular principal del tejido conectivo. Son células alargadas de origen mesodérmico con morfología fusiforme y que expresan diferentes proteínas como *Fibroblast Specific Protein 1* (FSP-1 o S100A4). Sus funciones son la síntesis de componentes de la MEC (colágeno I, III y V; y fibronectina), contribuir a la formación de las membranas basales (colágeno IV y laminina), regular la diferenciación epitelial, favorecer el cierre de herida y la inflamación. Además, sintetizan MMPs, enzimas implicadas en invasión tumoral (Öhlund *et al.*, 2014; Kalluri, 2016).

Los fibroblastos aislados de una herida o de tejido fibrótico segregan altos niveles de componentes de la MEC y poseen una alta capacidad de proliferación. A esta actividad incrementada se le denominada activación. Se considera que los tumores son heridas que nunca cicatrizan, por lo que sus fibroblastos están activados de forma constante, recibiendo el nombre de CAFs (Xing *et al.*, 2010; Cirri y Chiarugi, 2011; Valcz *et al.*, 2014; Kalluri, 2016). Hay evidencias de que la activación de los CAFs se produce bajo el control del estado redox. El factor TGF- $\beta$  provoca un incremento de ROS, que promueve que los CAFs adquieran un fenotipo similar a miofibroblastos, y por ende promuevan la actividad tumoral en cánceres, incluidos los de piel (Cirri y Chiarugi, 2011). Existen evidencias de que los CAFs provienen del mesénquima, de las células de la médula ósea o de las propias células cancerígenas mediante TEM (Kalluri y Zeisberg, 2006; Gonda *et al.*, 2010; Xing *et al.*, 2010; Dvořánková *et al.*, 2015; Shiga *et al.*, 2015; Ishii *et al.*, 2016). Se considera CAF a toda célula fibroblastoide, no neoplásica, no vascular, no epitelial y no inflamatoria presente en el tumor; si bien, no hay un consenso sobre su definición molecular, siendo las células no tumorales más abundantes en el microambiente tumoral (Öhlund *et al.*, 2014). Tienen forma de huso, fibras de estrés, una elevada producción de fibronectina, y capacidad proliferativa y migración incrementadas. Se ha descrito que difieren de los fibroblastos normales en casi 600 genes y un alto porcentaje de los mismos



presentan mutaciones genéticas en genes supresores tumorales como *P53* (Strnad *et al.*, 2010; Valcz *et al.*, 2014). En CAFs de CBC, y mediante ensayos de *array*, se han detectado 78 genes alterados en los pacientes, de los cuales 13 eran proteínas secretadas por CAFs, como: DCN, *Decorin*; COL5A2, *Collagen Type Va2*; LAMA2, *Laminin-alpha2/merosin*; MMP-11; CTSK, *Cathepsin K*; y ANGPTL2, *Angiopoietin-related Protein 2* (Micke *et al.*, 2007).

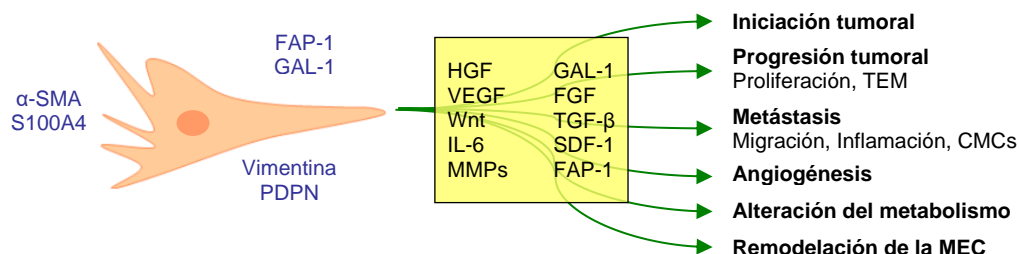
#### 1.4.2.1. Identificación de CAFs

Los CAFs son comúnmente identificados por la expresión de distintos marcadores de células mesenquimales y la ausencia de marcadores epiteliales y endoteliales (Fig. 9) (Gonda *et al.*, 2010; Xing *et al.*, 2010; Choi *et al.*, 2013; Öhlund *et al.*, 2014; Kalluri, 2016). En general, se ha considerado que todos los CAFs poseen un fenotipo de miofibroblasto, pero estos sólo representan una subpoblación que expresa  $\alpha$ -SMA (*Alpha-Smooth Muscle Actin*). Su expresión se relaciona con la inhibición de la migración de los fibroblastos y contribuye a la reorganización del citoesqueleto, aumentando su contractilidad, y es expresada también por los fibroblastos normales. Otro marcador es FAP-1 (*Fibroblast Activation Protein-1*), una proteasa de membrana con actividad colagenasa y dipeptidil peptidasa que degrada la MEC y estimula el crecimiento del tumor; en tejidos somáticos adultos, sólo se expresa en los fibroblastos activados de heridas y en el estroma tumoral (Teichgräber *et al.*, 2015). Asimismo, es empleado como marcador S100A4, una proteína de la familia S100 de proteínas pequeñas unidas a calcio, si bien, ésta también se expresa, entre otras, en fibroblastos normales (Strutz *et al.*, 1995; Andersen *et al.*, 2011). Otro marcador es Podoplanina (PDPN), una glicoproteína transmembrana que marca el endotelio linfático y se ha visto expresada en el frente tumoral y en los CAFs (Raica *et al.*, 2008; Kan *et al.*, 2014). En CBC, se observó que la expresión de Galectina-1 (GAL-1) era mayor en el estroma de los tumores que en epidermis normal, detectándose sus receptores en las células tumorales (Lacina *et al.*, 2007). Otros ejemplos de marcadores de CAFs son: vimentina; Thy-1, *Thymus cell antigen-1*; NG2, *Neuron-Glial antigen-2*; desmina; tenascina-C; periostina; vinculina; paxilina; tensina; PDGFR, *Platelet-Derived Growth Factor Receptor*; e incremento de la expresión de MMPs y proteínas de la MEC (Valcz *et al.*, 2014; Shiga *et al.*, 2015; Ishii *et al.*, 2016).

#### 1.4.2.2. Función de CAFs

No está claro si la proliferación local de CAFs está promovida por señales del tumor o si está reflejando un mecanismo de defensa para contener la lesión de convertirse en un carcinoma invasivo (Kalluri, 2016). En general, se acepta que los CAFs son claves en diferentes etapas del proceso tumoral, estimulan el crecimiento y progresión del tumor y

participan en mantener un estado de pobre diferenciación de las células circundantes (Hanahan y Weinberg, 2011; Augsten, 2014). Actúan de forma sinérgica con las células epiteliales para promover carcinogénesis e influenciar los patrones de invasividad y metástasis (Dvořánková *et al.*, 2012; Gonda *et al.*, 2010) (Fig. 9).



**Fig. 9 Marcadores y factores secretados por CAFs.** Los CAFs pueden ser identificados mediante distintos marcadores como  $\alpha$ -SMA, S100A4, FAP-1, GAL-1, Vimentina o PDPN, entre otros. Se comunican con las células cancerígenas mediante la segregación de factores (ejemplos en el cuadro amarillo) para promover la iniciación, progresión y metástasis tumoral. Asimismo colaboran con el proceso tumoral alterando el metabolismo de las células, promoviendo angiogénesis y remodelando la MEC.

Los CAFs podrían actuar en la **iniciación del cáncer**, favoreciendo la mutagenicidad de las células epiteliales, por ejemplo, segregando ROS, que favorecen la bajada del pH y la hipoxia en el ambiente tumoral (Xing *et al.*, 2010; Ishii *et al.*, 2016; Kalluri, 2016; Chan *et al.*, 2017).

Mientras que parece que los fibroblastos normales inhiben el crecimiento tumoral (Klein, 2014), los CAFs favorecen la **progresión tumoral** a través de comunicaciones específicas con las células tumorales, segregando factores de crecimiento, hormonas y citoquinas (VEGF, *Vascular Endothelial Growth Factor*; SDF-1, *Stromal Derived Factor-1*; MMPs; HGF, *Hepatocyte Growth Factor*; IL-6, Interleuquina-6; entre otros) (Xing *et al.*, 2010; Cirri y Chiarugi, 2011; Yang *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2014; Shiga *et al.*, 2015).

En el proceso de **metástasis**, los CAFs regulan la motilidad celular y la diseminación a órganos secundarios a través de contactos célula-célula, de señales paracrinas o induciendo la TEM. Asimismo, favorecen la metástasis manteniendo de forma crónica el estímulo **proinflamatorio** al promover estrés oxidativo y al activar proteínas como COX-2, NF- $\kappa$ B o HIF-1 (*Hypoxia-Inducible Factor*) (Cirri y Chiarugi, 2011). Los CAFs proporcionan, además, el ambiente adecuado a las **CMCs** para autorenovarse y diferenciarse. Según Öhlund *et al.* (2014), IL-6 o HGF, activan la ruta Wnt/ $\beta$ -cat en células neoplásicas y aumentan la expresión de marcadores de CMCs (CD44, ALDH1). En CBC, el nicho tumoral secreta factores similares a los de las CM normales, que evitan la diferenciación del CBC manteniendo la capacidad de autorenovación de las CMCs (Sneddon *et al.*, 2006). Además, los CAFs potencian la **TEM** de las células tumorales (Cirri y Chiarugi, 2011; Zhou *et al.*, 2014).

A parte de en las células epiteliales del cáncer, como se ha mencionado anteriormente, la **reprogramación metabólica** también ocurre en los CAFs, que

adquieren un metabolismo más glicolítico. Este cambio metabólico activa la producción de ROS, llevando a las células cancerígenas a la TEM, la adquisición de propiedades de CMCs y la evasión de la apoptosis (Cirri y Chiarugi, 2011; Li y Li, 2015).

#### 1.4.2.3. Implicación de los CAFs en resistencia a terapias

Los CAFs contribuyen a crear un ambiente protector favoreciendo las interacciones célula-célula y célula-MEC, la supervivencia celular y la supresión de las respuestas inmunes antitumorales. El **contacto directo** de los fibroblastos con las células tumorales ayuda a la supervivencia celular a través de la activación de vías antiapoptóticas o induciendo la TEM. Las células que han sufrido TEM pueden adquirir características de CMCs y resistencia a quimioterapéuticos (Valcz *et al.*, 2014). La adhesión de las células de cáncer a proteínas de la MEC segregadas por los CAFs -laminina, colágeno o fibronectina- impide la correcta difusión de la droga, lo que confiere resistencia (Kharaishvili *et al.*, 2014; Öhlund *et al.*, 2014; Valcz *et al.*, 2014; Ishii *et al.*, 2016). Las citoquinas y **factores de crecimiento segregados** por los CAFs provocan cambios transcripcionales en las células tumorales e influyen en la relación del tumor con la respuesta inmune, necesaria para una respuesta eficiente a terapias anticancerígenas, incluyendo la TFD (Cirri y Chiarugi, 2011; Li *et al.*, 2015). El papel de este tipo de interacción es importante en la resistencia a terapias con dianas moleculares específicas como el gefitinib, un inhibidor de EGFR (Öhlund *et al.*, 2014; Ishii *et al.*, 2016). Asimismo, se ha descrito que los **exosomas** -vesículas de origen endocítico- provenientes de los CAFs, promueven la quimioresistencia a 5-FU u oxiplatino en células de cáncer de colon (Fu *et al.*, 2016). Los CAFs también intervienen en la disminución de la efectividad de tratamientos anti-angiogénicos, como la terapia anti-VEGF (Öhlund *et al.*, 2014). Asimismo, los CAFs inducen resistencia a terapias hormonales; se ha visto que aumentan la actividad mitocondrial de células MCF7 de cáncer de mamá, confiriéndole resistencia a tamoxifeno (Martínez-Outschoorn *et al.*, 2011).

#### 1.4.3. Mecanismos de resistencia a TFD

Diferentes estudios ponen de manifiesto la resistencia a TFD a nivel preclínico en modelos celulares y animales (Singh *et al.*, 2001; Casas *et al.*, 2006; Rapozzi y Jori, 2015), así como en pacientes (Fiechter *et al.*, 2012; Gilaberte *et al.*, 2014; Bardazzi *et al.*, 2015). De forma general y como ya se ha mencionado, la eficacia de la TFD depende de la incorporación selectiva del FS por las células tumorales, los niveles de oxígeno presentes en el tejido y la dosis de irradiación (Bacellar *et al.*, 2015). Por tanto, dentro de los factores intracelulares implicados en la resistencia a TFD se incluyen los relacionados con una menor efectividad del FS, lo que depende de su: naturaleza, tasa diferencial de absorción

o expulsión, tráfico intracelular alterado y disminución o inactivación; o mutación y/o activación de genes, como los implicados en mecanismos de defensa de la propia célula contra las ROS generadas (Casas *et al.*, 2015; Rapozzi *et al.*, 2015; Galadari *et al.*, 2017).

La **disminución de la efectividad del FS** puede deberse a su expulsión por la actividad de transportadores de la familia MDR, como la P-glicoproteína (Pgp). En el caso de la PpIX generada a partir de ALA, sólo estaría implicada la proteína ABCG2 (Robey *et al.*, 2005; Ishikawa *et al.*, 2010; Kobuchi *et al.*, 2012; Barron *et al.*, 2013). Esta proteína ejerce una función protectora del ADN, puesto que, en estudios llevados a cabo en diferentes líneas tumorales tratadas con TFD-ALA, se ha visto que la inhibición de su actividad favorece una mayor concentración del FS en el área perinuclear, lo que incrementa la susceptibilidad del núcleo al daño generado por las ROS (Postiglione *et al.*, 2016). La resistencia múltiple a drogas es un importante mecanismo para la supervivencia de las células tumorales, y especialmente de las CMCs a la TFD, habiéndose descrito que muchas de estas células son positivas para ABCG2 (Ding *et al.*, 2010; Moitra *et al.*, 2011; Westover y Li, 2015). En relación al oxígeno disponible en el tejido, indispensable para la TFD, señalar que las CMCs están quiescentes en hipoxia, mientras que en un ambiente más oxigenado están activadas, presentando capacidad proliferativa y de migración, por lo que, con la TFD, la hipoxia severa puede favorecer la resistencia de estas células (Cojoc *et al.*, 2015).

Otras de las causas de una respuesta deficiente a TFD en CBC son las relacionadas de forma directa con la **alteración de genes** implicados en la formación del tumor y de los alterados como consecuencia del tratamiento. La luz UVA ocasiona mutaciones en genes clave para el desarrollo de tumores, como el oncogén *RAS* y el gen supresor de tumores *P53*; éste último con una frecuencia del 50-90 % en CCNM (van der Pols *et al.*, 2006; Benjamin *et al.*, 2008). *P53* es un gen relevante para la TFD, ya que se ha visto que tras la TFD-PpIX se produce muerte por apoptosis dependiente de esta proteína debido al fotodaño a la membrana mitocondrial, además de necrosis debida al fotodaño a la membrana citoplasmática (Zawacka-Pankau *et al.*, 2008; Acedo y Zawacka-Pankau, 2015). También se ha valorado la sobreexpresión de proteínas como ciclinas, proteínas encargadas de activar las CDKs a lo largo del ciclo celular, en la resistencia a TFD, especialmente la Ciclina D1, la cual es sobreexpresada en CEs resistentes a TFD-MAL (Gilaberte *et al.*, 2014; Qie y Diehl, 2016).

De igual modo, se ha observado la activación de la expresión de **genes de protección celular** como respuesta al estrés oxidativo generado por la TFD, como los que codifican para la COX-2, proteínas antiapoptóticas (PI3K/PKB, BCL2) o proteínas de reparación del daño inducido por estrés oxidativo, como NF- $\kappa$ B, HIF-1 o proteínas de choque térmico (HSP, *Heat Shock Protein*) (Broekgaarden *et al.*, 2015; Rodríguez *et al.*,

2016). Tanto las células normales como las cancerígenas controlan su nivel de ROS mediante moléculas implicadas en su producción y eliminación como el glutatión (GSH), la peroxidasa, la catalasa o la superóxido dismutasa (SOD) (Cook *et al.*, 2004). La respuesta celular a la TFD depende del tipo y cantidad de ROS y de la presencia y actividad de antioxidantes, por lo que una mayor expresión o actividad de enzimas antioxidantes pueden proteger a la célula contra ese daño (Yang *et al.*, 2008; Casas *et al.*, 2011; Gracia-Cazaña *et al.*, 2016). En este sentido, las células tumorales tienen niveles elevados de GSH, y se ha visto que la inhibición de su síntesis aumenta de forma muy significativa la eficacia de la TFD *in vitro*. Además, sobreexpresan enzimas de detoxificación, como la SOD o la hemoxygenasa-1 (HO-1 o HMOX-1) -la cual es inducida por TFD-, lo que disminuye su efecto. La HO-1 disminuye la eficacia de la TFD al descomponer el grupo hemo en biliverdina -antioxidante-, monóxido de carbono -antiinflamatorio- e ion ferroso; además, su actividad produce bilirrubina -antioxidante-, reduciendo la cantidad de ROS en el tejido (Agostinis *et al.*, 2011; Mikešová *et al.*, 2013; Dąbrowski y Arnaut, 2015; Chau, 2015; Kimáková *et al.*, 2017; Theodossiou *et al.*, 2017).

En cuanto a la implicación de los **CAFs** en la resistencia a TFD, se han realizado escasos estudios, y en ellos no se han obtenido conclusiones claras, no observándose, en general, efectos sobre la efectividad de la TFD (Chen *et al.*, 2015).

Por todo lo mencionado, la investigación dirigida a la búsqueda de mecanismos de la resistencia a TFD, escasa en la actualidad, es de gran interés y relevancia, con el objetivo de hacer más efectiva esta terapia contra el cáncer cutáneo más extendido a nivel mundial, el CBC. Se abordarán tanto mecanismos intrínsecos, como extrínsecos (CAFs). En el estudio de la implicación de los CAFs en la TFD este trabajo es pionero, ya que no existen trabajos previos donde este tipo de abordajes se haya realizado.

# 2

## Objetivos

El carcinoma basocelular (CBC) es el cáncer con mayor incidencia en la población mundial. Aunque su tasa de mortalidad es muy baja, es altamente mutilante, apareciendo fundamentalmente en zonas fotoexpuestas como la cara, el cuello o las extremidades. Por ello, es importante la optimización de terapias selectivas que dañen lo menos posible el tejido sano circundante, como es el caso de la terapia fotodinámica (TFD) con metil aminolevulinato (MAL), un precursor de fotosensibilizador aprobado en oncología dermatológica.

Además, el CBC presenta una alta tasa de recurrencia, lo que se asocia con la resistencia intrínseca o extrínseca a terapias. Los mecanismos intrínsecos se han relacionado con diversos procesos, como la obtención ineficiente de la droga, la pérdida de adhesión celular o la presencia de células madre del cáncer (CMC) -principales responsables de las recidivas-, entre otros. En cuanto a los factores extrínsecos, está cobrando gran relevancia, el efecto de los fibroblastos asociados a cáncer (CAFs). Sin embargo, éstos han sido escasamente estudiados en CBC. En este sentido, un mayor conocimiento de los mecanismos involucrados en la resistencia del CBC a la TFD-MAL puede ser de gran utilidad para la optimización de la aplicación clínica de esta terapia.

En este contexto, el objetivo general del presente trabajo consiste en **identificar factores intrínsecos implicados en la resistencia del CBC a TFD-MAL, así como valorar, en una primera aproximación, el papel de los fibroblastos aislados a partir de distintos subtipos de CBC en el proceso de resistencia.**

En base a este objetivo general se han planteado los siguientes objetivos específicos:

1. Obtener y caracterizar poblaciones resistentes a TFD-MAL de líneas celulares de CBC murino con diferentes características genéticas (gen *ptch* inactivo y presencia o ausencia de expresión de *p53*) mediante:
  - a) la valoración de la expresión de moléculas implicadas en la resistencia a TFD a nivel de adhesión, CMCs y ruta Wnt/ $\beta$ -cat.
  - b) la evaluación de la expresión de marcadores de carcinogénesis en distintos tipos de CBC humano.
2. Evaluar el potencial papel de los CAFs en la respuesta del CBC a TFD, a través de:
  - a) el análisis de la expresión de marcadores asociados a CAFs en fibroblastos aislados a partir de distintos tipos de CBC humanos.
  - b) la valoración del efecto de CAFs procedentes del subtipo de CBC invasivo en la respuesta a TFD de una línea de CBC murina.

# 3

## Materiales y Métodos



### 3.1. Líneas celulares

Para los estudios *in vitro* de resistencia del CBC a TFD se utilizaron tres líneas celulares establecidas de queratinocitos procedentes de CBCs originados en modelos murinos con genotipos específicos (Aszterbaum *et al.*, 1999; So *et al.*, 2006):

- ASZ001 (ASZ): ratones *ptch*<sup>+/-</sup> irradiados con luz UVB (515 mJ/cm<sup>2</sup>) tres veces por semana desde los 2 hasta los 12 meses de edad (aproximadamente 62 J/cm<sup>2</sup> en total).
- BSZ2 (BSZ): ratones *ptch*<sup>+/-</sup> K14-CreER, *p53*<sup>floxed/floxed</sup>. El gen *p53* fue eliminado en los queratinocitos basales mediante inyección de tamoxifeno a las 6 semanas de edad. Los ratones fueron irradiados con 5 Gy de <sup>137</sup>Cs cuando tenían 8 semanas.
- CSZ1 (CSZ): ratones *ptch*<sup>+/-</sup> K5-CrePR, *p53*<sup>floxed/floxed</sup>. El gen *p53* fue eliminado en queratinocitos basales mediante aplicación tópica de mifepristona (RU486), un antagonista de la progesterona, cuando los ratones tenían 6 semanas. La línea celular se originó a partir de un CBC espontáneo.

Además se emplearon como controles:

- P19: línea celular con características *stem* obtenidas a partir de un carcinoma embrionario de un ratón C3H/He macho.
- NIH/3T3: línea celular de fibroblastos murinos inmortalizados espontáneamente con expresión normal de *ptch*.

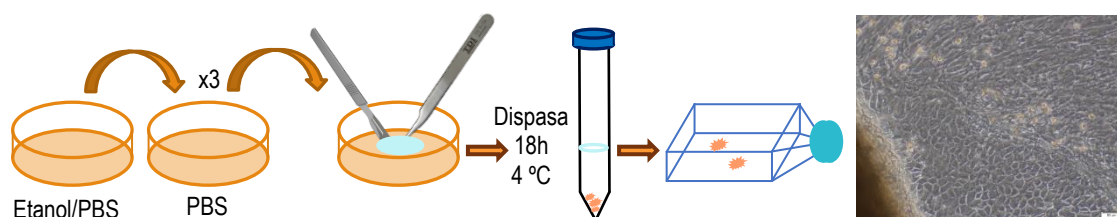
Asimismo, en la segunda parte del trabajo se han empleado cultivos primarios de fibroblastos asociados a distintos tipos de CBC, tal y como se indica en el apartado siguiente.

#### 3.1.1. Aislamiento de fibroblastos humanos asociados a CBC

Los fibroblastos humanos empleados en los ensayos fueron aislados a partir de biopsias de pacientes procedentes del Hospital Central de la Cruz Roja San José y Santa Adela de Madrid, tras la autorización del Comité Ético del Centro y la firma del debido consentimiento informado.

Las biopsias se conservaron durante el menor tiempo posible en suero salino. Para su cultivo se empleó un protocolo modificado de Beck *et al.* (2008) y Susan *et al.* (2011). Las biopsias se lavaron primero con etanol (Panreac) en PBS (*Phosphate Buffered Saline*, Thermo Scientific HyClone) 1:1, 3 veces en PBS y se trocearon sobre una placa Petri con 1 mL de Dispasa II (Sigma) en PBS 1:1. Posteriormente, se añadieron 5 mL más de Dispasa II y el tejido se incubó toda la noche a 4 °C, centrifugándose a continuación a 1300 rpm 10 min. El pellet se lavó dos veces con medio de cultivo KGM (*Keratinocytes*

*Growth Medium*) (ver apartado siguiente), centrifugándose tras cada lavado y, por último, se resuspendió en medio de cultivo y se sembró en frascos de cultivo F12,5 (**Fig. 10**). Todo el proceso fue llevado a cabo en condiciones de esterilidad. Cuando el cultivo alcanzó aproximadamente un 70 % de confluencia, los fibroblastos se separaron de los queratinocitos mediante tripsina 0,05 % y se resembraron en frascos F25 en DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) con 10 % de suero fetal bovino (FBS), todo de Thermo Scientific HyClone.



**Fig. 10 Aislamiento de fibroblastos a partir de biopsias de CBC.** Para aislar fibroblastos a partir de las biopsias humanas de distintos tipos de CBC, se lavaron las muestras con etanol/PBS 1:1 y tres veces con PBS. A continuación se trocearon mecánicamente y se incubaron con Dispasa II durante 18 h a 4 °C. Al día siguiente, tras una serie de lavados y centrifugaciones con medio tipo KGM, se sembraron y se dejaron crecer.

### 3.2. Cultivos y mantenimiento de las células

Para el cultivo y mantenimiento de las células se empleó el medio DMEM alto en glucosa, suplementado con 1 % de Penicilina/Estreptomicina (P/S) y un 10 % de FBS, todo de Thermo Scientific HyClone. En general, se empleó tripsina 0,05 %, excepto para las líneas BSZ y CSZ y las células obtenidas a partir de los tumores murinos que se empleó una concentración de tripsina de 0,25 %.

Para el aislamiento de los fibroblastos humanos se empleó un medio de cultivo tipo KGM, con la siguiente composición: 3:1 DMEM 4,5 mg/mL glucosa: Ham's F12 suplementado con 10 % FBS,  $1,8 \times 10^{-4}$  M adenina (Sigma), 0,4 µg/mL hidrocortisona (Sigma), 5 µg/mL insulina y transferrina (Gibco), 10 ng/mL EGF (Sigma), 1,36 ng/mL triyodo-L-tironina (T3), 2 mM L-glutamina (Gibco) y 100 IU/mL-100 µg/mL P/S. Los fibroblastos, una vez aislados, se crecieron en DMEM con 10 % de FBS.

Las células de CBC murino fueron congeladas en DMEM, mientras que los fibroblastos se congelaron en FBS; en ambos casos con un 10 % de DMSO (Dimetilsulfóxido) (Panreac).

### 3.3. Anticuerpos

Los anticuerpos empleados se recogen en la **Tabla 1**. Además, para detectar la proteína Endoglina se empleó un hibridoma cedido por la Dra. Luisa María Botella

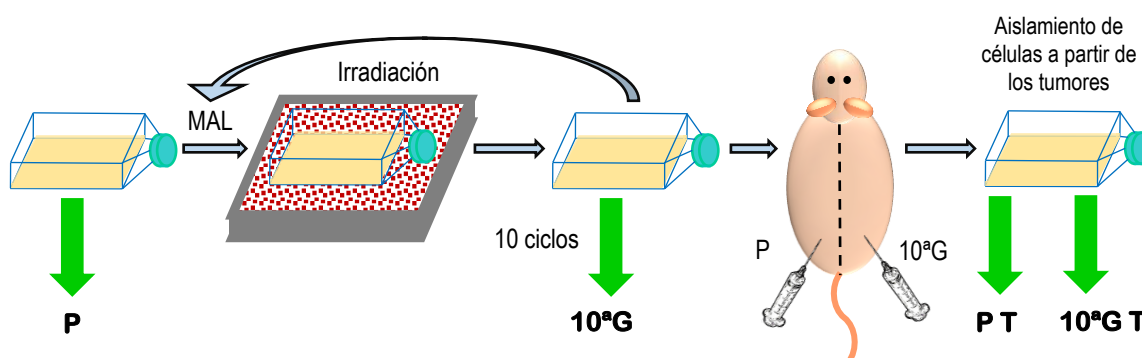
(Instituto de Investigaciones Biológicas, Madrid, CSIC). Asimismo, se usó Phalloidin-Alexa 546 (Sigma) para la detección de la F-actina mediante microscopía de fluorescencia.

<i>Anticuerpo</i>	<i>Casa comercial</i>	<i>Técnica</i>
<b>Primario</b>		
Mouse monoclonal anti-E-cadherin	BD Transduction Laboratories	WB, IF
Mouse monoclonal anti-MMP-9	Santa Cruz Biotechnologies	IF
Mouse monoclonal anti-Nanog	Santa Cruz Biotechnologies	IF
Mouse monoclonal anti-N-cadherin	Zymed	WB, IF
Mouse monoclonal anti-Sox2	Cell Signaling	IF
Mouse monoclonal anti-vinculin	Sigma	WB, IF
Mouse monoclonal anti- $\beta$ -actin	Abcam	WB
Mouse monoclonal anti- $\beta$ -catenin	BD Transduction Laboratories	WB, IF
Mouse monoclonal anti- $\beta$ -catenin active	Millipore	IF
Rabbit monoclonal anti-Galectin-1	Cell Signaling	WB, IF
Rabbit monoclonal anti-GAPDH	Abcam	WB
Rabbit monoclonal anti-Glutathione synthetase	Abcam	WB, IF
Rabbit monoclonal anti-gsk3 $\beta$	Abcam	WB, IF
Rabbit monoclonal anti-Oct4A	Cell Signaling	IF
Rabbit monoclonal anti-S100A4	Cell Signaling	IF
Rabbit monoclonal anti-UCP2	Cell Signaling	WB, IF
Rabbit polyclonal anti-alpha smooth Actin	Abcam	WB, IF
Rabbit polyclonal anti-Fap-1	Santa Cruz Biotechnologies	WB, IF
Rabbit polyclonal anti-Hemeoxygenase-1	Cell Signaling	WB, IF
Rabbit polyclonal anti-p53	Novocastra	WB
Rabbit polyclonal anti-vimentin	Abcam	WB, IF
Actin-Smooth Muscle Clone 1A4	Vitro	IHQ
Cyclin D1 Clone SP4	Vitro	IHQ
Epidermal growth factor receptor Clone EP22	Vitro	IHQ
P53 Clone SP5	Vitro	IHQ
Podoplanin Clone D2-40	Vitro	IHQ
Sox-2 Clone SP76	Vitro	IHQ
<b>Secundario</b>		
Goat anti-mouse Alexa Fluor® 488	Life Technologies	IF
Goat anti-mouse IgG peroxidase conjugate	Thermo Fisher	WB
Goat anti-rabbit Alexa Fluor® 546	Invitrogen	IF
Goat anti-rabbit IgG Horseradish peroxidase conjugate	Thermo Fisher	WB

**Tabla 1** Anticuerpos primarios y secundarios empleados en inmunofluorescencia (IF), *Western Blot* (WB) e inmunohistoquímica (IHQ).

### 3.4. Terapia fotodinámica y generación de líneas resistentes de CBC

Para los tratamientos fotodinámicos se empleó el compuesto precursor del fotosensibilizador PpIX, MAL (Sigma). Las células fueron incubadas durante 5 h a concentraciones determinadas de MAL en DMEM sin FBS (Stock 10 mM en agua destilada) e irradiadas con dosis variables de luz roja, con una lámpara de LEDs (*Light Emission Diode*) rojos (635 nm) (Segainvex, UAM) con una irradiancia de 7,5 mW/cm<sup>2</sup>. El tiempo de incubación se fijó en 5 h en base a estudios previos del laboratorio, que indican que se produce suficiente cantidad de PpIX, pero sin ser tóxica *per se*. Las células resistentes fueron generadas a partir de las líneas celulares parentales (P) ASZ, BSZ y CSZ sometidas a 10 ciclos de TFD-MAL (Milla *et al.*, 2011). En cada ciclo se seleccionaron condiciones de tratamiento que ocasionaban una supervivencia inferior al 20 % (evaluada mediante ensayo MTT). Para el primer ciclo se fijó una misma dosis de luz para las tres líneas (2 J/cm<sup>2</sup>) y se buscó la concentración de MAL adecuada, quedando ésta fijada para el resto de ciclos (0,3 mM ASZ, 0,4 mM BSZ y 0,2 mM CSZ). Una vez fijadas las concentraciones, se procedió a incrementar la dosis de luz en cada ciclo, según fuese necesario, para obtener la supervivencia indicada (menor al 20 %). Las células que sobrevivían al tratamiento se dejaban crecer hasta alcanzar confluencia, momento en el que eran amplificadas y sometidas a un nuevo tratamiento de TFD variando la dosis en base al mismo criterio de supervivencia. Se repitió este proceso 10 veces para obtener líneas resistentes (10<sup>a</sup>G) (Fig. 11).



**Fig. 11** Obtención de líneas de CBC resistentes a TFD. Se generaron líneas resistentes a 10 ciclos de TFD (10<sup>a</sup>G) a partir de las líneas P, incubándolas con MAL e irradiándolas a tiempos variables con luz roja y dejando crecer las supervivientes. Las líneas P y 10<sup>a</sup>G fueron inyectadas en ratones, en los que generaron tumores. A partir de estos tumores se aislaron mediante explante las células P T y 10<sup>a</sup>G T.

La tasa de resistencia de las 10<sup>a</sup>G frente a las P se determinó mediante el índice *fold-change* para unas condiciones de tratamiento (concentración y dosis de irradiación) determinadas:

$$\text{Fold} - \text{change} = \frac{\% \text{ Supervivencia } 10^a G}{\% \text{ Supervivencia } P}$$

### 3.4.1. TFD con medio condicionado de fibroblastos

Para los ensayos de TFD con medio condicionado de fibroblastos humanos, se seleccionó la línea celular CSZ. Sus poblaciones P y 10<sup>a</sup>G fueron sembradas en placas P24 en una concentración de 1,4x10<sup>-4</sup> células/mL. Por otra parte, se condicionó el medio DMEM 0,5 % FBS durante 24 h con fibroblastos seleccionados para este ensayo (control SL01 y CAFs invasivos SL15). A continuación, se añadió el medio condicionado a las placas con las células neoplásicas y se co-cultivaron durante 48 h. Para los tratamientos fotodinámicos se administró la droga en medio condicionado sin FBS y se siguió el protocolo descrito anteriormente para la TFD en este tipo celular (5 h de incubación con 0,2 mM MAL e irradiación con distintas dosis de luz roja). La supervivencia se evaluó mediante ensayo MTT.

### 3.5. Ensayos de tumorigenicidad

Para los estudios de tumorigenicidad de las líneas murinas de CBC se emplearon ratones hembras Athymic Nude-*Foxn1<sup>nu</sup>* de 8 semanas de edad (Envigo, Francia). Estos ratones presentan una mutación autosómica recesiva en el locus *nu* del cromosoma 11. Son ratones albinos sin pelo o con un posible crecimiento intermitente del mismo. Sus células B tienen una función normal pero tienen un timo rudimentario disfuncional. Son deficientes en células T y no generan células citotóxicas efectoras, lo que los hace inmunocomprometidos y no muestran rechazo contra injertos.

Los ratones fueron repartidos de forma aleatoria en 3 grupos de 5 ratones (**Tabla 2**). Cada individuo fue identificado mediante una marca en la oreja (Ø, OD, OI, 2OD, ODOI). Cada grupo fue inoculado en el flanco izquierdo con la línea P y en el derecho con la línea resistente 10<sup>a</sup>G. Se inocularon 1,5 millones de células en 50 µL de PBS y 50 µL de Matrigel® (Corning), el cual está compuesto de laminina, colágeno IV, entactina y proteoglicanos (Tilley *et al.*, 2016). Durante los días siguientes se realizó el seguimiento de los animales, midiéndose el progresivo aumento del tamaño de cada uno de los tumores visibles con un calibre automático. Se tomó como volumen total del tumor la suma del volumen de todos los lóbulos. El volumen de cada tumor fue calculado con la siguiente fórmula:

$$V = \frac{4}{3} \pi * \left( \frac{\text{longitud} + \text{ancho} + \text{profundidad}}{3} \right)^3$$

Nº de ratones	Línea celular	Población	Flanco
5	ASZ	P	Izquierdo
		10 <sup>a</sup> G	Derecho
5	BSZ	P	Izquierdo
		10 <sup>a</sup> G	Derecho
5	CSZ	P	Izquierdo
		10 <sup>a</sup> G	Derecho



**Tabla 2** Diseño del experimento de tumorigenicidad en modelo murino.

Cuando los tumores, parentales o resistentes, alcanzaron un volumen total máximo de aproximadamente 500 mm<sup>3</sup> se procedió al sacrificio de los animales mediante CO<sub>2</sub>. Tras el sacrificio, se extirparon los tumores y cada uno de ellos se dividió en 3 partes que fueron sometidas a distintos procesamiento: (1) se fijaron en formaldehído al 3,7 % en PBS (Panreac) para estudios histopatológicos, (2) se congelaron a -80 °C para estudios moleculares, (3) se lavaron en etanol y se conservaron en PBS conteniendo 2 µg/mL de anfotericina B (Fisher Scientific) hasta su siembra para el aislamiento de los queratinocitos tumorales.

### 3.5.1. Aislamiento de queratinocitos de CBC murino

El cultivo celular de los tumores inducidos por la inyección de las células de CBC se realizó por explante. Las muestras conservadas en PBS fueron lavadas con etanol/PBS 1:1 en esterilidad y posteriormente con PBS estéril 3 veces. Después fueron disgregadas mecánicamente con un bisturí y sembradas sobre placas de Petri de 35 mm de diámetro con medio de cultivo DMEM suplementado con 1 % P/S, 10 % FBS y 1 % anfotericina B. Cuando comenzaron a formar las primeras colonias de queratinocitos, estos fueron aislados mediante tripsinización y las poblaciones fueron denominadas P T y 10<sup>a</sup>G T (Giard *et al.*, 1973) (**Fig. 11**).

### 3.6. Morfología de las células en cultivo

La morfología celular se estudió mediante microscopía de contraste de fases (CF) y mediante microscopía de campo claro previa tinción de las células con azul de toluidina (Sigma). En este caso, las células fueron sembradas sobre cubreobjetos, fijadas en metanol absoluto (Panreac) a -20 °C durante 7 min, dejadas secar al aire y posteriormente teñidas con azul de toluidina 0,025 % en agua destilada durante 5 min. A continuación, los cubreobjetos se lavaron abundantemente con agua destilada, se secaron al aire, se sumergieron en xilol y se montaron en definitivo con DePeX (Serva).

### 3.7. Tamaño, complejidad y ciclo celular

---

El análisis del tamaño, la complejidad y la distribución en el ciclo celular se realizó mediante citometría de flujo (Cytomics FC500 de 1 láser, Beckman Coulter). Las células fueron tripsinizadas y lavadas en PBS mediante centrifugación. Para la evaluación del tamaño celular se tomó como medida el *forward scatter*. Esta medida varía con el tamaño celular, el índice de refracción y la presencia de material con distinta absorción de luz; se consideró que no existirían cambios en estos dos últimos entre las líneas P y 10<sup>8</sup>G. La complejidad celular fue evaluada mediante el *side scatter*, que nos proporciona información de la granulosidad y complejidad estructural del interior celular.

Para el análisis del ciclo celular se empleó el kit DNAprep (Beckman Coulter). El pellet obtenido mediante centrifugación se resuspendió en 50 µL del detergente del kit y se añadió 1 mL de yoduro de propidio, incubándose durante 30 min a 37 °C. Posteriormente, las células se conservaron a 4 °C en oscuridad hasta su medida. Se realizaron al menos tres experimentos.

### 3.8. Supervivencia celular

---

La evaluación de la supervivencia celular, tras los diferentes tratamientos, se llevó a cabo mediante el ensayo MTT, basado en la reducción metabólica de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol, por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, en sal de formazán, un compuesto liposoluble de color azul. Transcurridas 24 h de los tratamientos, los cultivos fueron incubados con una disolución de MTT 500 µg/mL (Sigma) en DMEM durante 3 h. El formazán fue solubilizado con DMSO. La lectura de la densidad óptica se realizó en un lector de placas (SpectraFluor, Tecan) a 542 nm. Los porcentajes de supervivencia celular se calcularon en relación a los controles no tratados ([Mosmann, 1983](#)).

### 3.9. Proliferación celular

---

La tasa de proliferación de las diferentes líneas celulares se determinó utilizando el ensayo de formación de colonias o de clonogenicidad. Para ello, se sembró un mismo número de células de cada tipo celular (250/pocillo) en placas P6 con o sin Matrigel® y se dejaron crecer durante 7 días. Posteriormente, los cultivos se lavaron con PBS frío (4 °C) y se tiñeron con cristal violeta (Aldrich Company, Inc) 0,2 % en 2 % etanol en agua destilada durante 20 min en agitación a temperatura ambiente. A continuación se lavaron con PBS, las placas se dejaron secar y las colonias fueron contabilizadas en número y clasificadas en grupos en función del tamaño (pequeñas <1,5 mm; medianas > 1,5 mm y < 2,5 mm; y grandes > 2,5 mm). Asimismo, las células se lisaron y el colorante se



resuspendió con SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) 1 % (Panreac) y la densidad óptica se midió con el lector de placas a 570 nm. Para el recubrimiento con Matrigel® a cada placa se le añadieron 50 µl del producto a una concentración de 500 µg/mL, se dejaron secar durante 1 h y se retiró, a continuación, el excedente. Las placas se lavaron con medio sin suero y se mantuvieron con medio sin suero limpio hasta la siembra de las células.

### 3.10. Producción y localización subcelular de PpIX

---

La producción de PpIX a partir de MAL se determinó mediante citometría de flujo. Para ello, las células se incubaron durante 5 o 24 h con la concentración adecuada de MAL. Posteriormente, se tripsinizaron, se centrifugaron 7 min a 1600 rpm y se fijaron en 1 mL de formaldehído 3,7 % en PBS a temperatura ambiente durante 10 min. El fijador se eliminó por centrifugación (5 min a 1600 rpm), las células se lavaron dos veces en PBS y se mantuvieron en oscuridad a 4 °C hasta su evaluación en el citómetro (FC500 Cytomics 2 láseres, Beckman Coulter).

La localización subcelular de la PpIX en los cultivos se determinó mediante microscopía de fluorescencia. Para ello, las células crecidas sobre cubreobjetos se incubaron 24 h con distintas concentraciones de MAL en DMEM 1 % FBS y posteriormente observadas en un microscopio de fluorescencia Olympus BX-61 utilizando la línea de excitación de 546 nm.

### 3.11. Producción de ROS

---

La producción de ROS, en los fibroblastos aislados de CBCs, se estudió mediante citometría de flujo. Para ello se incubaron las células con Dihidrofluoresceína Diacetato (DHF-DA), la cual entra en las células, se desacetoxila a un compuesto no fluorescente, que al ser oxidado da lugar a la fluoresceína, un compuesto fluorescente ([Hempel et al., 1999](#)). Los cultivos celulares se incubaron con 6 µM de DHF-DA (Abcam) durante 1 h en DMEM sin FBS. Transcurrido ese tiempo las células se tripsinizaron y centrifugaron 10 min a 2100 rpm. Se fijaron con formaldehído 3,7 % en PBS durante 15 min a temperatura ambiente. El fijador fue retirado mediante centrifugación (5 min a 2100 rpm). Se conservaron en PBS a 4 °C hasta su medida en el citómetro (FC500 Cytomics 2 láseres, Beckman Coulter).

### 3.12. Extracción de ARN, RT-PCR y análisis de expresión por *arrays*

---

El ARN mensajero (ARNm) fue aislado utilizando el mini kit RNeasy de Qiagen. La concentración y la pureza (ratio A260:A280≥1,8) del ARN se determinaron mediante espectrofotometría (NanoDropND1000, Nanodrop Technologies).



La expresión de ARNm se evaluó mediante RT-PCR (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) utilizando los reactivos correspondientes de Roche y los primers específicos (**Tabla 3**). El análisis semicuantitativo de los resultados de la PCR se realizó utilizando el método DDCT (software LC480 1.5) que corrige los datos de Cq obtenidos con cada muestra para el gen analizado en relación al valor del gen de referencia ARNr (ARN ribosómico) 18S de cada ADN complementario (ADNc). Fue necesaria la preamplificación de las secuencias de *MMP-1*, *MMP-9*, *Nanog* y *Oct4*. Los genes *Nanog* y *Oct4* mostraron expresiones muy bajas tras dicha preamplificación, llegando a no detectarse en algunos extractos, por lo que se consideró que los datos mostrados en el apartado de resultados no son totalmente concluyentes. Asimismo, *Aldh1a1* no fue detectada en alguno de los extractos analizados, lo que impidió realizar análisis estadístico por falta de repeticiones. Los análisis fueron realizados en la Unidad Genómica Antonia Martín Gallardo de la Fundación Parque Científico de Madrid (Cantoblanco, Madrid).

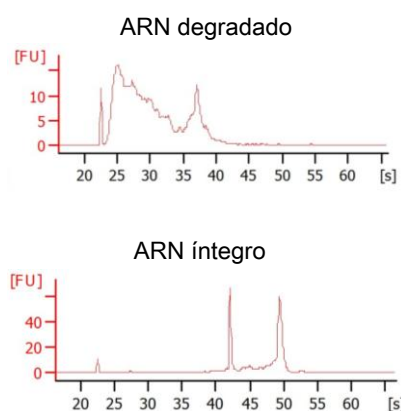
<i>Gen</i>	<i>Especie</i>	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>
<i>Abcg2</i>	Ratón	GCACAGAAGGCCTTGGAGTA	AGGGTTGTTGTAGGGCTCAC
<i>Aldh1a1</i>	Ratón	CCTTGCATTGTGTTTGCAGATG	GCTCGCTCAACACTCCTTTTC
<i>E-cad</i>	Ratón	ATCCTCGCCCTGCTGATT	ACCACCGTTCTCCTCCGTA
<i>Nanog</i>	Ratón	GCCTCCAGCAGATGCAAG	GGTTTTGAAACCAGGTCTTAACC
<i>Oct4</i>	Ratón	GTTGGAGAAGGTGGAACCAA	CTCCTTCTGCAGGGCTTTC
<i>p53</i>	Ratón	GCAACTATGGCTTCCACCTG	TTATTGAGGGGAGGAGAGTACG
<i>ptch wt</i>	Ratón	CTGCGGCAAGTTTTTGGTTG	AGGGCTTCTCGTTGGCTACAAG
<i>ptch mutado</i>	Ratón	GCCCTGATGAACTGCAGGACG	CACCGGGTAGCCAACGCTATGTC
<i>Sox2</i>	Ratón	TCAAAGAGATACAAGGGAATTGG	GGATGGGATTGGTGGTTTTT
<i>FAP-1</i>	Humano	TCTAAGGAAAGAAAGGTGCCAA	GATCAGTGCGTCCATCATGAAG
<i>GAL-1</i>	Humano	TGGTCGCCAGCAACCTGAATCTCA	TAGTTGATGGCCTCCAGGTTGAGG
<i>MMP-1</i>	Humano	CATGAAAGGTGGACCAACAATTT	CCAAGAGAATGGCCGAGTTC
<i>MMP-9</i>	Humano	TTGACAGCGACAAGAAGTGG	GCCATTCACGTCGTCCTTAT
<i>S100A4</i>	Humano	AGTTCAAGCTCAACAAGTCAGAACTAA	TCATCTGTCCTTTCCCAAGA
<i><math>\alpha</math>-SMA</i>	Humano	GCAGCCCAGCCAAGCACTGT	TGGGAGCATCGTCCCAGCA

**Tabla 3** Secuencias de los primers empleados para el análisis del ARNm mediante RT-PCR de los genes correspondientes, tanto los empleados en las muestras de ratón como en las de humano.

El análisis de expresión de genes relacionados con estrés oxidativo en CAFs de CBCs de pacientes se llevó a cabo mediante matrices o *arrays* (Qiagen). Para ello, en primer lugar y con el objetivo de seleccionar aquellas muestras válidas para este tipo de análisis, se realizó un estudio de integridad del ARN utilizando el bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies). Los distintos ARNs extraídos se separaron mediante

electroforesis en gel de agarosa y, utilizando un software específico, se obtuvo un resultado cualitativo y cuantitativo reflejado en los correspondientes electroferogramas (perfiles de picos) (**Fig. 12**). En ellos, además de la concentración de ARN total de la muestra, se indica el estado de los ARN ribosómicos (ARNr) 5S, 18S y 28S. La relación 18S/28S se utiliza para caracterizar el estado del ARN de la muestra y se expresa mediante un algoritmo denominado RIN (número de integración del ARN, *RNA Integrity Number*). Además, se validó por RT-PCR la expresión de tres genes seleccionados: *UCP2* (*Uncoupling Protein 2*), *HO-1* y *GSS* (Glutatión sintetasa); con las sondas TaqMan (Thermo Fisher Scientific) específicas y tomando como referencia la  $\beta$ -actina. Estos análisis fueron realizados en la Unidad de Genómica del Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols (Madrid).

Grupo	Muestra	RIN	260/280
Control	SL01	9,6	2,1
	SL02	9,4	2,09
	SL03	9,5	2,13
	SL13	9,3	1,97
Superficial	SL07	9,5	1,98
	SL08	9,6	1,88
	SL09	9,5	2,08
	SL16	9,6	2,09
Nodular	SL04	8,8	1,57
	SL05	8,6	1,86
	SL06	8,8	2,11
Invasivo	SL14	8,7	2,06
	SL10	9,6	2,05
	SL11	9,6	2,08
	SL12	9,5	2,03
	SL15	9,6	1,95



**Fig. 12** Estado del ARN de los fibroblastos aislados a partir de CBCs humanos. Se caracterizó el estado del ARN, previamente a la realización de los arrays, mediante la relación 18S/28S y expresado mediante el algoritmo RIN. Los valores de RIN pueden oscilar de 0 a 1, siendo 0 un ARN totalmente degradado y 10 uno en condiciones óptimas. Como se puede observar en la tabla, todas las muestras presentaron valores de RIN superiores a 8,5 lo que indica un buen estado del ARN.

### 3.13. Inmunofluorescencia

El análisis de la localización y del patrón de expresión intracelular de determinadas proteínas se llevó a cabo mediante IF. Para ello, las células fueron sembradas sobre cubreobjetos, fijadas con formaldehído 3,7 % en PBS durante 30 min a 4 °C y permeabilizadas con Tritón X-100 0,1 % en PBS durante 30 min a temperatura ambiente. A continuación, se incubaron durante 1 h a 37 °C con el anticuerpo primario correspondiente (**Tabla 1**), se lavaron con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario apropiado durante 45 min a 37 °C. Los anticuerpos primarios y secundarios se administraron diluidos en PBS/BSA 0,5 % (*Bovine Serum Albumin*, Sigma) a las concentraciones recomendadas por las casas comerciales. Por último, las muestras se montaron con ProLong® conjugado con DAPI (Life Technologies) para la contratinción nuclear.

### 3.14. Electroforesis de proteínas y *Western Blot*

Los extractos celulares fueron obtenidos con el buffer RIPA/Tritón pH 7,4 (Bioworld) con inhibidores de fosfatasas (PhosSTOP EASYpack, Roche) y de proteasas (cOmplete ULTRA Tablets Mini EDTA-free EASYpack, Roche), siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Se determinó la concentración de proteína de los extractos obtenidos de cada una de las muestras, mediante el método de cuantificación colorimétrico basado en el ácido bicinconínico (BCA Protein Assay Kit, Pierce). Posteriormente, los extractos se diluyeron en tampón Laemmli (Bio-Rad) y las electroforesis se realizaron en geles de acrilamida/bisacrilamida al 6, 7,5, 10 o 12 % en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), utilizando un soporte "Miniprotean" (Bio-Rad). Posteriormente, las proteínas fueron transferidas a membranas de PVDF (Polifluoruro de vinilideno) (Bio-Rad) con el sistema de transferencia TransBlot Turbo (Bio-Rad). Las membranas se bloquearon con leche en polvo desnatada o BSA al 5 % en TBS (*Tris-Buffered Saline*)-Tween® 20 al 0,1 %, según el requerimiento del anticuerpo, durante al menos 1 h a temperatura ambiente en agitación. Después se incubaron con el anticuerpo primario diluido en la misma solución de bloqueo durante toda la noche a 4 °C en agitación, se lavaron con TBS-Tween® 20 0,1 % y se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa, durante 2 h a temperatura ambiente (**Tabla 1**). El revelado se llevó a cabo mediante quimioluminiscencia (kit ECL Plus, Amershan) utilizando el sistema de alta definición ChemiDocTR XRS+ (Bio-Rad). Las bandas correspondientes a las diferentes proteínas fueron digitalizadas utilizando el programa Image Lab versión 3.0.1 (Bio-Rad).

La concentración de proteínas en los medios de cultivo condicionados con fibroblastos fue determinada mediante el método del BCA.

### 3.15. Análisis de la actividad de MMPs

El análisis de la actividad de la MMP-2 y MMP-9 se realizó mediante zimografía. Para ello, se condicionó medio de cultivo DMEM 0,5 % FBS durante 24 h con fibroblastos. Se recogió el medio, se centrifugó 5 min a 5.000 rpm y se congeló con Laemmli 1X. Para la realización de la zimografía se emplearon geles de electroforesis de poliacrilamida 10 % con gelatina (Bio-Rad). Se realizó la electroforesis en condiciones no desnaturalizantes en un soporte "Miniprotean" a 80 V. A continuación se realizaron 3 lavados de 30 min con Tritón X100 2,5 % en H<sub>2</sub>O destilada, un lavado con H<sub>2</sub>O destilada y se incubó a 37 °C en Buffer de revelado (50 mM Tris HCl pH 7,5; 200mM NaCl; 10 mM CaCl<sub>2</sub>). Se tiñó el gel con Azul de Coomassie (0,5 g Azul de Coomassie; 50 mL ácido acético glacial; 100 mL metanol; 350 mL H<sub>2</sub>O destilada) y se destiñó con la solución correspondiente (500 mL

metanol; 100 mL ácido acético glacial; 400 mL H<sub>2</sub>O destilada). La toma de imágenes y la digitalización de las bandas se realizaron de igual modo que para los WB.

### 3.16. Estudios histológicos

---

Las muestras de tumor destinadas al análisis histológico se fijaron por inmersión en formaldehído 3,7 % en PBS durante 12 h a 4 °C. Posteriormente, se lavaron y deshidrataron en series crecientes de alcoholes antes de su inclusión en parafina. Las secciones histológicas (5 µm de espesor) se montaron sobre portaobjetos con carga electrostática (Superfrost® Plus, Thermo Scientific). Finalmente, las secciones se desparafinaron (15 min en xilol, Panreac), se hidrataron en series de alcohol decrecientes (15 min en etanol 100 %, 5 min en etanol 96 % y 5 min en etanol 70 %) y se lavaron con agua destilada.

#### 3.16.1. Tinción con Hematoxilina/Eosina (H/E) y con Rojo de alizarina

Para los estudios morfológicos las secciones se tiñeron con hematoxilina durante 5 min, se lavaron abundantemente con agua y se sumergieron en eosina alcohólica durante 6 min (Panreac). Finalmente, se lavaron con agua, se deshidrataron en series crecientes de alcohol, se pasaron por xilol y se montaron con DePex. Para la tinción de depósitos de calcio, las secciones de los tumores de los ratones se tiñeron 12 min con rojo de alizarina 0,1 % KOH 0,5 % en agua destilada, pH 4,1-4,3. Tras la tinción se deshidrataron las muestras con pases en acetona, acetona/xilol 1:1 y xilol y se montaron en DePex.

#### 3.16.2. Inmunohistoquímica

Las secciones procedentes de las biopsias de los pacientes fueron procesadas de acuerdo a los protocolos seguidos por el Hospital Central de la Cruz Roja San José y Santa Adela (Madrid), utilizando productos de la casa comercial Vitro. Brevemente, las secciones se desparafinaron e hidrataron con el buffer correspondiente, procediéndose posteriormente a la inhibición de la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno. A continuación, se realizó la incubación con el anticuerpo primario durante el tiempo indicado por la casa comercial (**Tabla 1**). Se incubó con el amplificador del anticuerpo primario durante 15 min. Posteriormente, las muestras se incubaron con el Master Polimer Plus durante 30 min a temperatura ambiente, evitando su exposición a la luz. Se aclaró con Buffer Tween® 20 entre cada uno de los pasos anteriores. Las muestras se revelaron con diaminobenzidina (DAB) durante 5 min a temperatura ambiente. A continuación, las preparaciones se lavaron con agua destilada y se incubaron con el intensificador de la tinción, el DAB Enhacer, durante 2 min. Una vez lavadas con agua destilada, las muestras se contrastaron con hematoxilina durante 1-2 min, se lavaron con agua corriente y se

deshidrataron en alcoholes (70, 80, 90 y 99 %), se pasaron por xilol y se montaron con medio de montaje permanente.

### 3.17. Microscopía y análisis estadísticos

---

Las observaciones microscópicas y la captura de imágenes se realizaron utilizando un microscopio de epifluorescencia acoplado a una cámara CCD DP70 (Olympus BX-61), con filtros de luz de excitación UVA (360-370 nm, filtro de excitación UG-1), azul (450-490 nm, filtro de excitación BP 490) o verde (570-590 nm, filtro de excitación DM 590).

Todos los experimentos fueron realizados, al menos, tres veces -exceptuando la actividad de MMPs-. Las pruebas estadísticas correspondientes se llevaron a cabo utilizando la versión 24.0 del paquete estadístico SPSS Statistics (IBM®).

El análisis de las variables paramétricas se realizó mediante un análisis de la varianza ANOVA de un factor. Se realizó una prueba post hoc de Bonferroni y t-Student para comparaciones por parejas (\*:  $P < 0,1$ ; \*\*:  $P < 0,05$ ; \*\*\*:  $P < 0,01$ ; \*\*\*\*:  $P < 0,001$ ), entre aquellas variables que no presentaban significación estadística en la prueba de homogeneidad de la varianza de Levene. Se empleó la prueba de Games-Howell para aquellas variables paramétricas con significación estadística en la prueba de la varianza de Levene.

Para variables no paramétricas -el volumen de las lesiones acumuladas en el modelo murino para cada día-, se utilizó el análisis bivalente de Kruskal-Wallis para evaluar la existencia de diferencias entre todas las condiciones estudiadas y, posteriormente, el test U de Mann-Whitney para muestras independientes para realizar las comparaciones por parejas fijando el nivel de significación en  $P < 0,05$ .

# 4

## Resultados

## 4.1. Resistencia de líneas de CBC murino a TFD

### 4.1.1. Obtención de líneas celulares resistentes

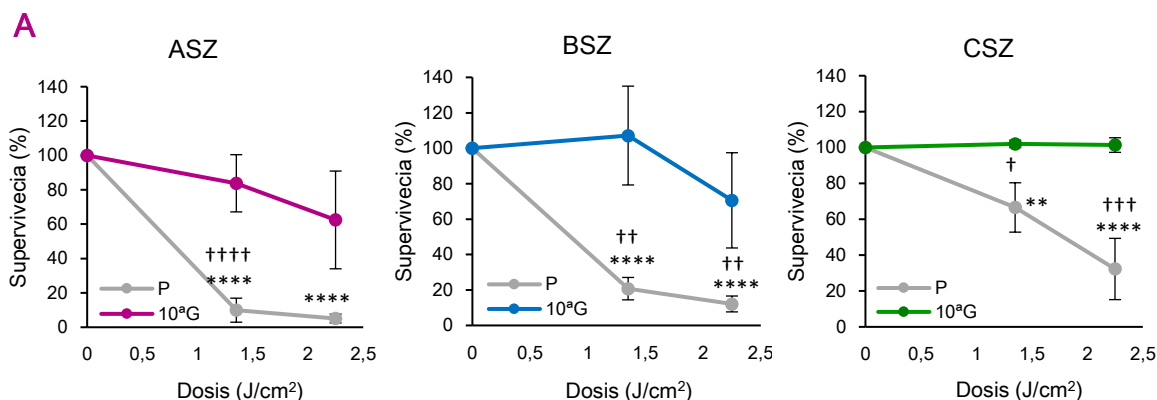
Para el estudio del proceso de resistencia del CBC a TFD se utilizaron las líneas ASZ, BSZ y CSZ. A partir de dichas células, que denominamos parentales (P), se generaron poblaciones resistentes a 10 ciclos de TFD (10<sup>a</sup>G) de acuerdo a lo descrito por Milla *et al.* (2011). Para obtener la primera generación se fijó la dosis inicial de irradiación (2 J/cm<sup>2</sup>) y se buscaron las concentraciones de MAL a las cuales el tratamiento ocasionaba un 80 % de letalidad para cada línea celular. Dichas concentraciones fueron 0,3 mM, 0,4 mM y 0,2 mM para las ASZ, BSZ y CSZ, respectivamente. Las siguientes generaciones se obtuvieron administrando estas mismas concentraciones de MAL y variando las dosis de luz. Cuando las células supervivientes a cada tratamiento alcanzaban la confluencia, eran sometidas a un nuevo ciclo de TFD. La **Tabla 4** recoge las condiciones de tratamiento que se aplicaron para la obtención de las distintas generaciones resistentes.

Nº Generación	ASZ: 0,3 mM MAL	BSZ: 0,4 mM MAL	CSZ: 0,2 mM MAL	
1ª	2 J/cm²			
2ª	4 J/cm²	3 J/cm²	4 J/cm²	
3ª			4,5 J/cm²	
4ª				
5ª			5 J/cm²	
6ª	4,5 J/cm²		6 J/cm²	
7ª			7,5 J/cm²	
8ª	5 J/cm²		10 J/cm²	
9ª			12 J/cm²	
10ª	5.5 J/cm²			

**Tabla 4** Obtención de líneas celulares murinas resistentes a TFD. Se indican las distintas condiciones empleadas para generar, a partir de las líneas P de CBC murino, ASZ, BSZ y CSZ, células resistentes a 10 ciclos de TFD-MAL (10<sup>a</sup>G). Se seleccionaron en cada ciclo las condiciones que causaban un porcentaje de muerte igual o superior al 80 % (de acuerdo al ensayo MTT). Se mantuvo constante la concentración de MAL para cada línea.

Una vez obtenidas las 10<sup>a</sup>G, se procedió a validar su resistencia. Para ello, ambas poblaciones, P y 10<sup>a</sup>G, fueron sometidas a una nueva TFD utilizando las concentraciones fijadas de MAL para cada una de las líneas y dos dosis de luz roja (1,35 y 2,25 J/cm<sup>2</sup>). La **Fig. 13 A** muestra cómo las células P de las tres líneas (ASZ, BSZ y CSZ) eran sensibles a la TFD produciéndose un porcentaje significativo de muerte con ambas dosis ( $P < 0,001$ ; CSZ P con 1,35 J/cm<sup>2</sup>  $P < 0,05$ ). Bajo estas mismas condiciones, las poblaciones 10<sup>a</sup>G no disminuyeron su supervivencia de forma significativa respecto al control. Comparando la supervivencia de las poblaciones P y 10<sup>a</sup>G de cada línea, se observó que con la dosis más baja (1,35 J/cm<sup>2</sup>) la línea celular ASZ 10<sup>a</sup>G era significativamente más resistente ( $P < 0,001$ ), y la de BSZ ( $P < 0,05$ ) y CSZ (1,35 J/cm<sup>2</sup>  $P < 0,05$ ; 2,25 J/cm<sup>2</sup>  $P < 0,01$ ) lo eran

con ambas dosis. El índice *fold-change* fue superior a 1 en todas las líneas celulares (**Fig. 13 B**).



**B**

$$\text{Fold - change} = \frac{\% \text{ Supervivencia } 10^9\text{G}}{\% \text{ Supervivencia } P}$$

	ASZ	BSZ	CSZ
Fold-change (1,35 J/cm²)	8,44	5,16	1,53
Fold-change (2,25 J/cm²)	12,3	5,82	3,14

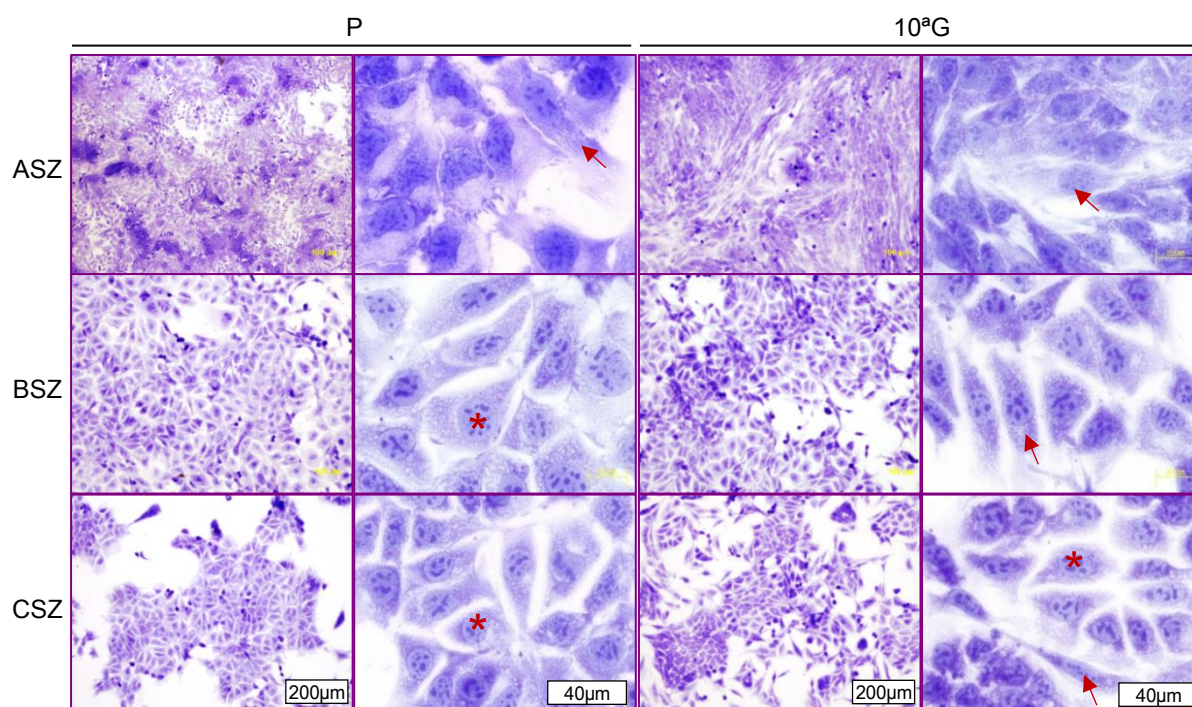
**Fig. 13 Resistencia a TFD de las poblaciones 10<sup>9</sup>G.** Se analizó la resistencia a TFD de las 10<sup>9</sup>G respecto a sus P mediante el ensayo MTT. Para cada línea se empleó la concentración de MAL con la que se generaron las 10<sup>9</sup>G (0,3 mM ASZ; 0,4 mM; CSZ 0,2 mM). (**A**) La población ASZ 10<sup>9</sup>G era significativamente más resistente que su P con 1,35 J/cm² de luz roja, y BSZ y CSZ 10<sup>9</sup>G con ambas dosis. \*: Diferencia significativa respecto al control sin irradiar para esa misma línea; †: Diferencia de la 10<sup>9</sup>G respecto a su P para una misma dosis de luz. (**B**) El índice *fold-change* indicó mayor resistencia de las 10<sup>9</sup>G a TFD que las P en las tres líneas celulares. (\*\*:  $P < 0,05$ ; \*\*\*:  $P < 0,01$ ; \*\*\*\*:  $P < 0,001$ ).

#### 4.1.2. Características diferenciales de las poblaciones P y 10<sup>9</sup>G

##### 4.1.2.1. Aspectos morfológicos

Las características morfológicas de las poblaciones P y 10<sup>9</sup>G, de cada línea celular, analizadas tras la tinción de las células con azul de toluidina se muestran en la **Fig. 14**. La población ASZ P posee una morfología más alargada y fibroblastoide que las poblaciones BSZ y CSZ P, que muestran un aspecto más poligonal. Además, las células ASZ P tienden a crecer de forma aislada, mientras que las otras dos poblaciones forman colonias bien definidas en las que las células se encuentran adheridas unas a otras. La población ASZ 10<sup>9</sup>G no presenta cambios llamativos en su morfología respecto a su P, pero sí parece apreciarse una mayor presencia de células alargadas en los cultivos. Por su parte, las células BSZ 10<sup>9</sup>G muestran, en general, una forma más alargada que sus P. El cambio más relevante se observó en CSZ 10<sup>9</sup>G, apreciándose dos morfologías diferenciadas en los cultivos: una población de células con tipología similar a las P (poligonal y con crecimiento en colonias) y una segunda población fibroblastoide que tiende a situarse alrededor de la población poligonal.

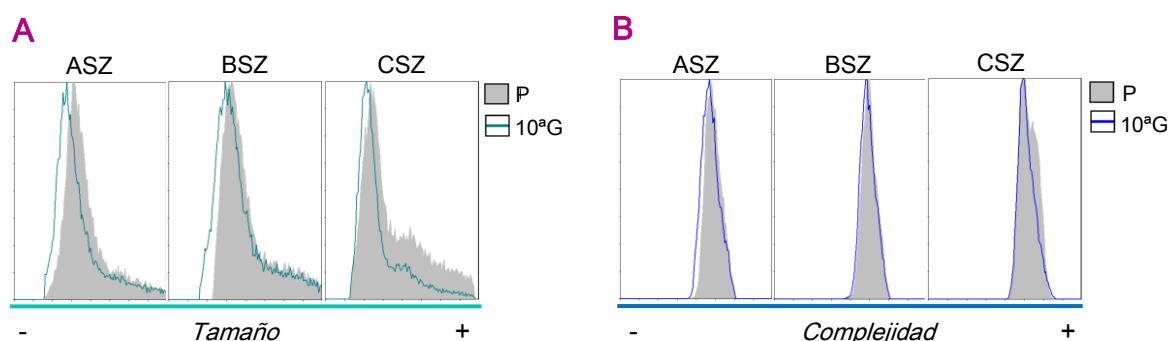




**Fig. 14** Morfología de las poblaciones P y 10ªG de CBC murino. Imágenes de las células tras su tinción con azul de toluidina. Las ASZ P eran células con aspecto espinoso (flecha) y que crecían aisladas. Las BSZ y CSZ P mostraban una morfología poligonal (asterisco) y crecían en colonias apretadas. En ASZ y BSZ 10ªG se observaron células con una morfología más alargada o fibroblastoide (flecha). En los cultivos de CSZ 10ªG se apreciaron dos morfologías celulares diferenciadas, unas poligonales pequeñas que crecían formando colonias (asterisco) y otras fibroblastoides que crecían rodeando a las primeras (flecha).

#### 4.1.2.2. Tamaño y complejidad celular

El tamaño y la complejidad celular se evaluaron mediante citometría de flujo. El análisis del tamaño celular (*forward scatter*) (**Fig. 15 A**) reveló una disminución del mismo en las células 10ªG respecto a sus P, especialmente en el caso de CSZ, cuya 10ªG presentó una notable reducción de la población de células de mayor tamaño. El análisis de la complejidad celular (*side scatter*) (**Fig. 15 B**), indicó que la de las poblaciones ASZ y BSZ 10ªG era muy similar a la de sus P; en CSZ 10ªG se redujo y la población resultó más homogénea.



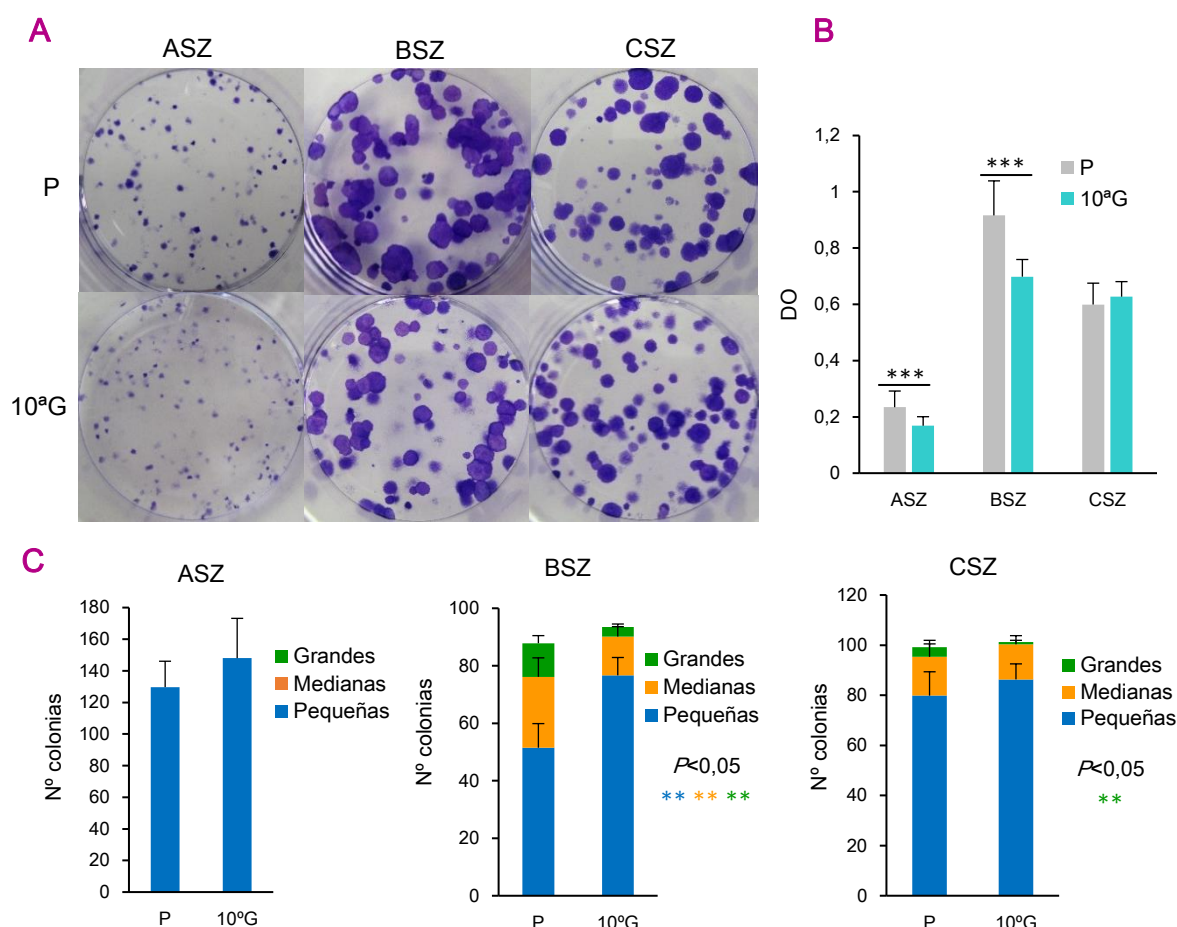
**Fig. 15** Tamaño y complejidad celular de las poblaciones P y 10ªG de CBC murino. Se estudiaron el tamaño (*forward scatter*) y la complejidad celular (*side scatter*) mediante citometría de flujo. **(A)** Se apreció una ligera disminución del tamaño en todas las poblaciones 10ªG respecto a sus P, especialmente en CSZ. **(B)** La complejidad sólo parecía disminuir en la población CSZ 10ªG respecto a su P. Se muestra un experimento representativo.

#### 4.1.2.3. Capacidad de proliferación

Se valoró tanto la capacidad proliferativa (tamaño de las colonias) como su eficiencia de adhesión a la placa o plaqueo (número de colonias) con o sin Matrigel®, de las poblaciones P y 10<sup>a</sup>G mediante el método de formación de colonias o de clonogenicidad. A los 7 días de la siembra, las colonias formadas se tiñeron, contabilizaron y midieron, clasificándose en base a su diámetro en tres grupos: pequeñas (<1,5 mm), medianas (>1,5 mm, <2,5 mm) y grandes (>2,5 mm). Además, se estimó la densidad celular de los cultivos mediante la medida de absorbancia del cristal violeta. Los resultados obtenidos sin Matrigel® (**Fig. 16**) mostraron que no existían diferencias significativas en el número de colonias generadas por las 10<sup>a</sup>G respecto a sus P. Las ASZ P y 10<sup>a</sup>G sólo generaron colonias pequeñas. Las poblaciones BSZ y CSZ P y 10<sup>a</sup>G dieron lugar a colonias de todos los tamaños, predominando las pequeñas. La BSZ P originó un número significativamente menor de colonias pequeñas y mayor de colonias medianas y grandes que las 10<sup>a</sup>G ( $P<0,05$ ). La población CSZ P formó un número significativamente mayor de colonias grandes que su 10<sup>a</sup>G ( $P<0,05$ ). La medida de la absorbancia del cristal violeta indicó densidad celular menor en los cultivos de ASZ y BSZ 10<sup>a</sup>G respecto a sus correspondientes P ( $P<0,01$ ) (**Fig. 16 B**).

Dado que en la situación fisiológica las células epiteliales no se encuentran aisladas, sino embebidas en la MEC, a continuación, se procedió a valorar la capacidad de formación de colonias en placas recubiertas de Matrigel® (**Fig. 17**), una mezcla comercial de componentes de MEC que proporciona un sustrato más próximo a la situación *in vivo*. Como en el ensayo previo, ASZ P y 10<sup>a</sup>G generaron un número similar de colonias pequeñas, aunque en este caso también formaron un número muy reducido de colonias medianas y grandes. La población BSZ P formó un mayor número total de colonias ( $P<0,05$ ) y, al igual que sin Matrigel®, dio lugar a un mayor número de colonias medianas y grandes que su 10<sup>a</sup>G ( $P<0,05$ ). En CSZ P y 10<sup>a</sup>G no se observaron diferencias significativas en el número de colonias, aunque en P el número de colonias medianas y grandes era superior ( $P<0,05$ ). La densidad celular del cultivo disminuyó en BSZ 10<sup>a</sup>G respecto a su P ( $P<0,05$ ) (**Fig. 17 B**).

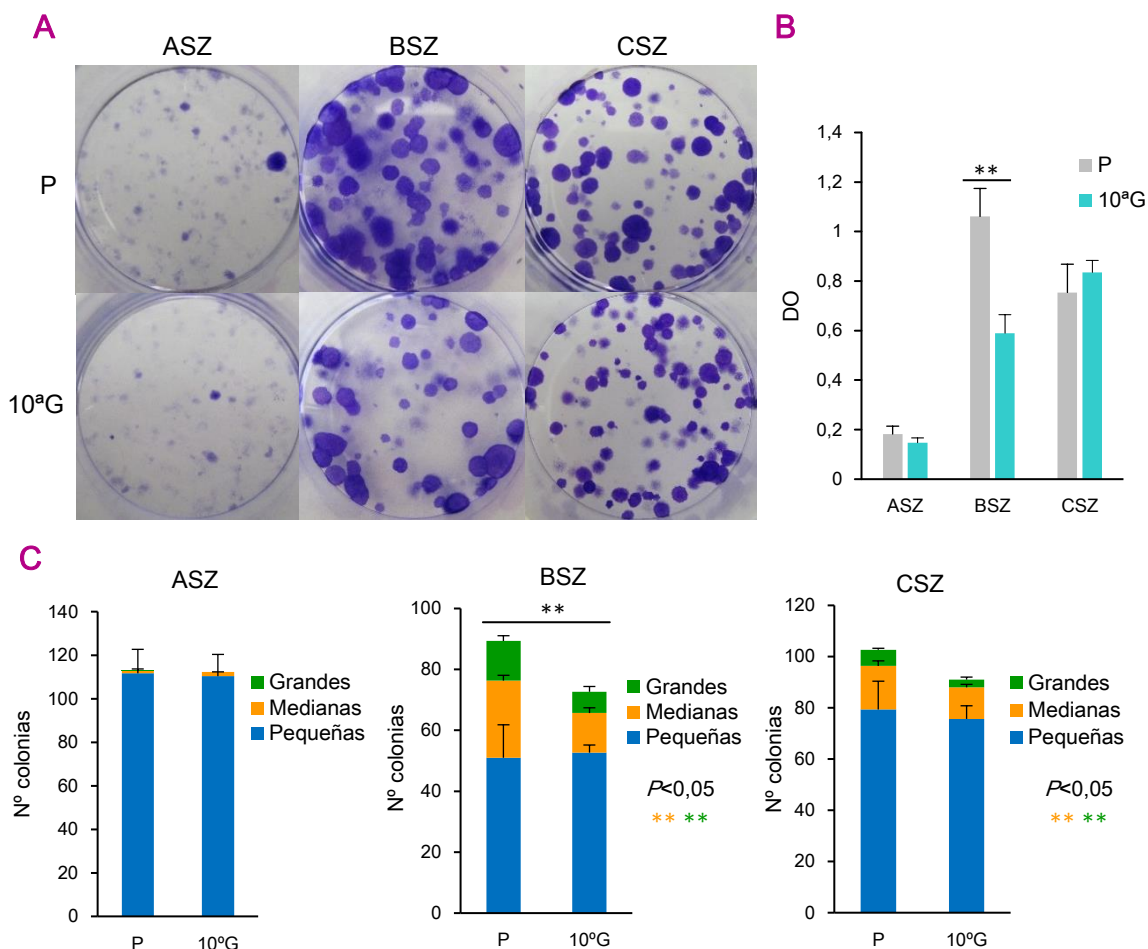
A partir de ambos experimentos podemos indicar que las células ASZ poseen mayor capacidad para adherirse al sustrato (plaqueo) y, por tanto, para generar un mayor número de colonias. Por el contrario, BSZ y CSZ son más proliferativas, ya que sus colonias alcanzan un mayor tamaño a los 7 días.



**Fig. 16 Proliferación y eficiencia de adhesión.** La capacidad proliferativa y la eficiencia de adhesión a la placa de las poblaciones P y 10<sup>a</sup>G de las líneas ASZ, BSZ y CSZ, se evaluaron mediante el ensayo de clonogenicidad 7 días después de su siembra en una placa de cultivo. **(A)** Las colonias se tiñeron con cristal violeta para su posterior recuento y clasificación en tres grupos en base a su diámetro: pequeñas (<1,5 mm), medianas (>1,5 mm, <2,5 mm) y grandes (>2,5 mm), así como para la medida de la absorbancia del cristal violeta. Se muestra un experimento representativo. **(B)** La cuantificación colorimétrica, efectuada mediante un lector de placas (570 nm), indicó una disminución de la densidad celular en las 10<sup>a</sup>G de ASZ y BSZ. **(C)** En cuanto al número total de colonias formadas y, por tanto, la eficiencia de adhesión, no se encontraron diferencias significativas entre las P y las 10<sup>a</sup>G de ninguna de las líneas celulares. Sin embargo, la distribución por tamaños de las colonias si fue significativamente diferente entre P y 10<sup>a</sup>G de BSZ y CSZ. (\*\*:  $P < 0,05$ ; \*\*\*:  $P < 0,01$ ).

#### 4.1.2.4. Estudio del ciclo celular

La **Fig. 18** muestra los porcentajes de células que se encontraron en las diferentes etapas del ciclo celular (G0/G1, S y G2/M), obtenidos mediante citometría de flujo. Las tres líneas celulares presentaban un ciclo celular normal, con aproximadamente un 50 % de células en fase G0/G1, un 25 % en fase S, un 20-25 % en G2/M y un bajo porcentaje eran poliploides. En ninguna de las líneas celulares se encontraron diferencias significativas entre las poblaciones P y 10<sup>a</sup>G en ninguna de las etapas del ciclo celular.



**Fig. 17 Proliferación y eficiencia de adhesión en Matrigel®.** La capacidad proliferativa de las poblaciones P y 10<sup>a</sup>G de las líneas ASZ, BSZ y CSZ, se estudió mediante ensayo de clonogenicidad transcurridos 7 días desde su siembra sobre una capa de Matrigel®. **(A)** Las colonias se tiñeron con cristal violeta y posteriormente se clasificaron en 3 grupos según su diámetro: pequeñas (<1,5 mm), medianas (>1,5 mm, <2,5 mm) y grandes (>2,5 mm), y se midió la absorbancia del colorante. Se muestra un experimento representativo. **(B)** La cuantificación colorimétrica del cristal violeta utilizando un lector de placas (570 nm) reveló una disminución de la densidad celular en BSZ 10<sup>a</sup>G respecto a su P. **(C)** El número total de colonias fue significativamente mayor en BSZ P que en su 10<sup>a</sup>G, mientras que entre P y 10<sup>a</sup>G de ASZ y CSZ no se encontraron diferencias significativas. La distribución de las colonias por tamaño mostró diferencias significativas en BSZ y CSZ. (\*\*:  $P < 0,05$ ).

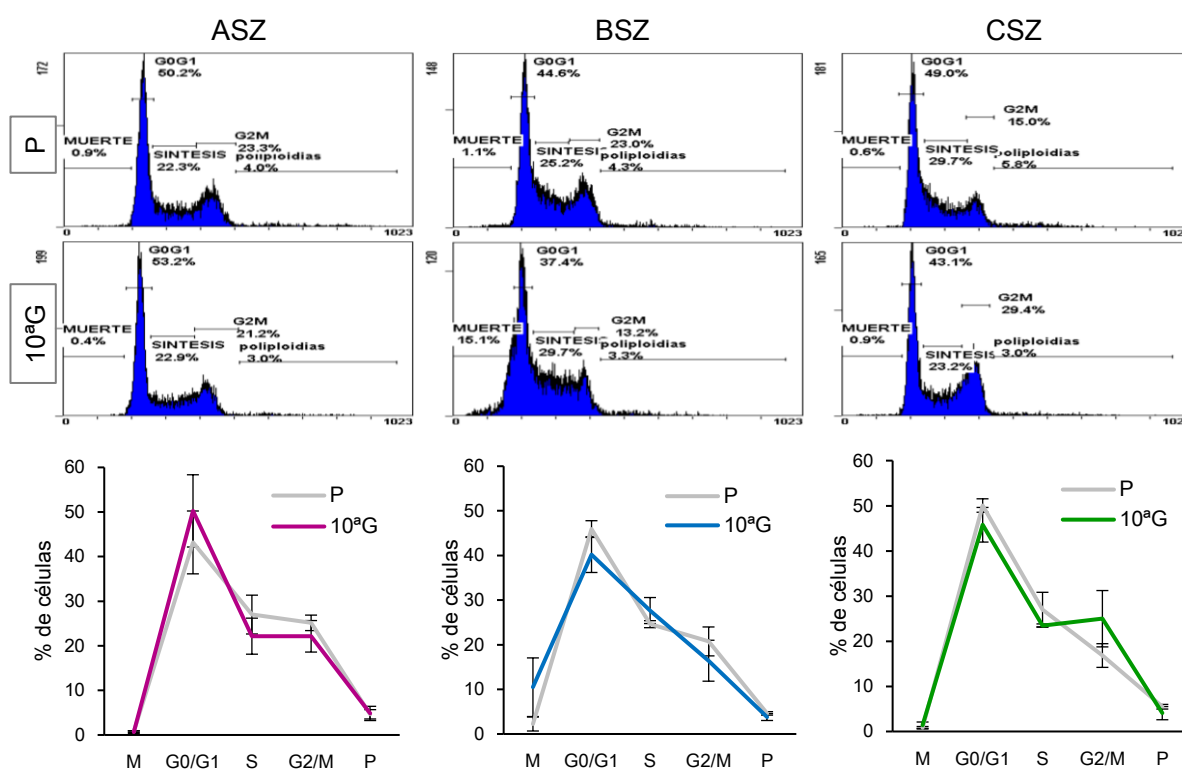
#### 4.1.2.5. Localización y producción de protoporfirina IX

La diferente respuesta a TFD observada entre las poblaciones P y 10<sup>a</sup>G de cada línea celular podría deberse a diferencias en el patrón de localización intracelular o en la producción de PpIX a partir de MAL. Por ello, se realizaron los correspondientes estudios.

La localización subcelular de PpIX se evaluó mediante microscopía de fluorescencia bajo luz de excitación UVA (**Fig. 19 A**). Tras 24 h de incubación con las correspondientes concentraciones de MAL (0,3 mM ASZ; 0,4 mM BSZ; 0,2 mM CSZ), se apreciaron diferencias de localización entre las poblaciones P y 10<sup>a</sup>G. Ambas poblaciones presentaron señal fluorescente a nivel de la membrana celular en las tres líneas celulares. Además, se detectó señal nuclear en ASZ y BSZ P, señal que no se apreció en las BSZ 10<sup>a</sup>G y muy escasamente en ASZ 10<sup>a</sup>G. En CSZ P sólo se detectó señal en la membrana



celular y en las 10<sup>a</sup>G la señal era más difusa y la fluorescencia era mayor en las poblaciones poligonales que en las de morfología fibroblastoide.



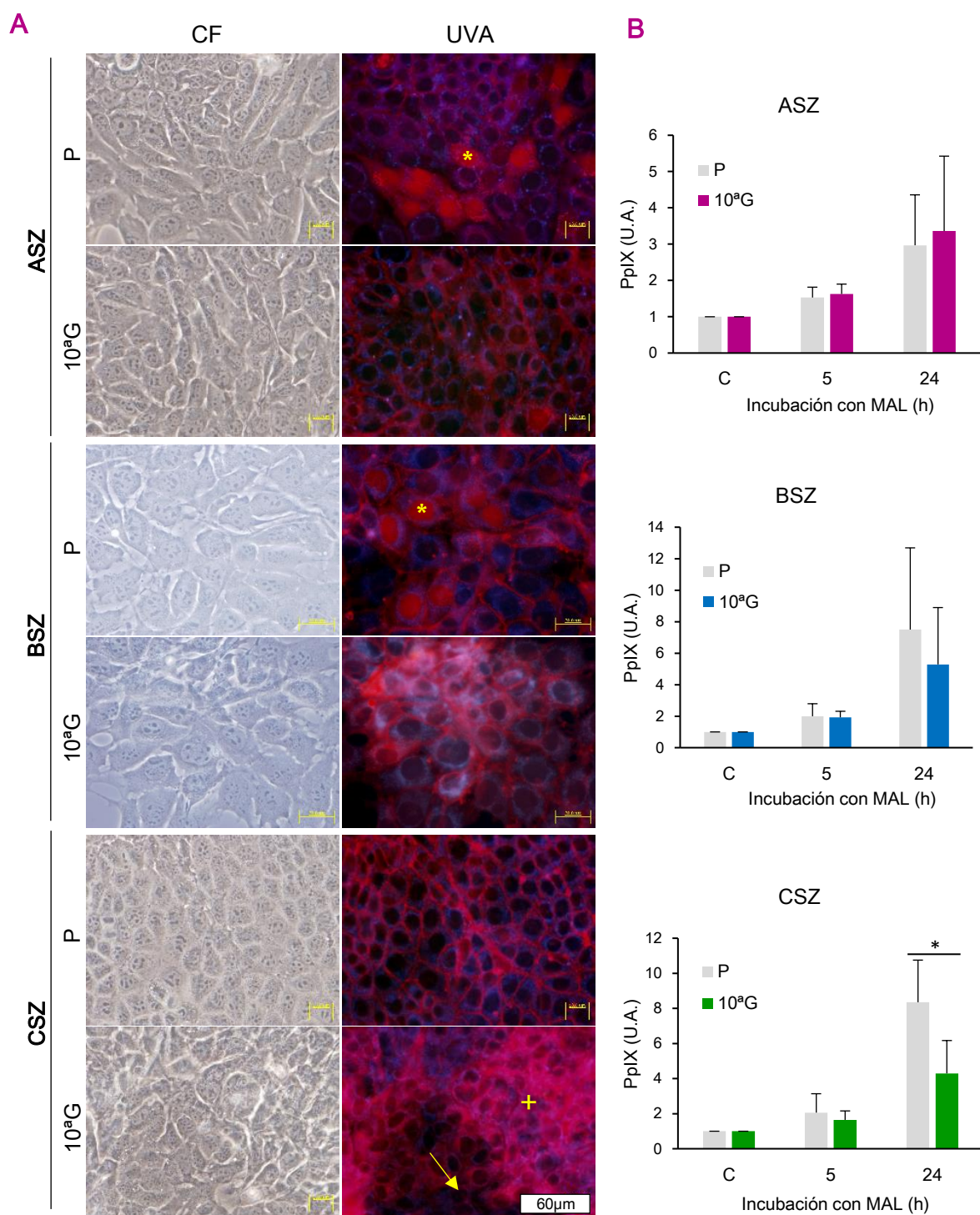
**Fig. 18** Análisis del ciclo celular de las poblaciones P y 10<sup>a</sup>G de las líneas de CBC murino. Se muestran los perfiles de ciclo celular obtenidos mediante citometría de flujo. Todas las poblaciones presentaban una distribución de las células en las distintas fases del ciclo similar entre ellas, no existiendo diferencias significativas entre el ciclo de las P y las 10<sup>a</sup>G en ninguna de las líneas.

La producción de PpIX se evaluó determinando los niveles intracelulares mediante citometría de flujo tras 5 y 24 h de incubación de las células con sus respectivas concentraciones de MAL (**Fig. 19 B**). En todas las líneas se determinó que la PpIX intracelular aumentaba con el tiempo de incubación con MAL. No se apreciaron diferencias significativas en la producción de PpIX ni a 5 h ni a 24 h entre las células P y 10<sup>a</sup>G en ninguna de las tres líneas celulares ( $P < 0,1$ ), excepto para las 24 h en CSZ, tiempo en el que las 10<sup>a</sup>G produjeron menor cantidad de PpIX que las P. No obstante, en general, se apreció una tendencia hacia una menor producción de PpIX en las células de 10<sup>a</sup>G respecto a sus correspondientes P.

#### 4.1.2.6. Estudios *in vivo*

##### 4.1.2.6.1. Capacidad tumorigénica de las líneas de CBC

La capacidad tumorigénica de las poblaciones de CBC murino P y de sus correspondientes resistentes 10<sup>a</sup>G se evaluó en ratones inmunodeprimidos nu/nu.



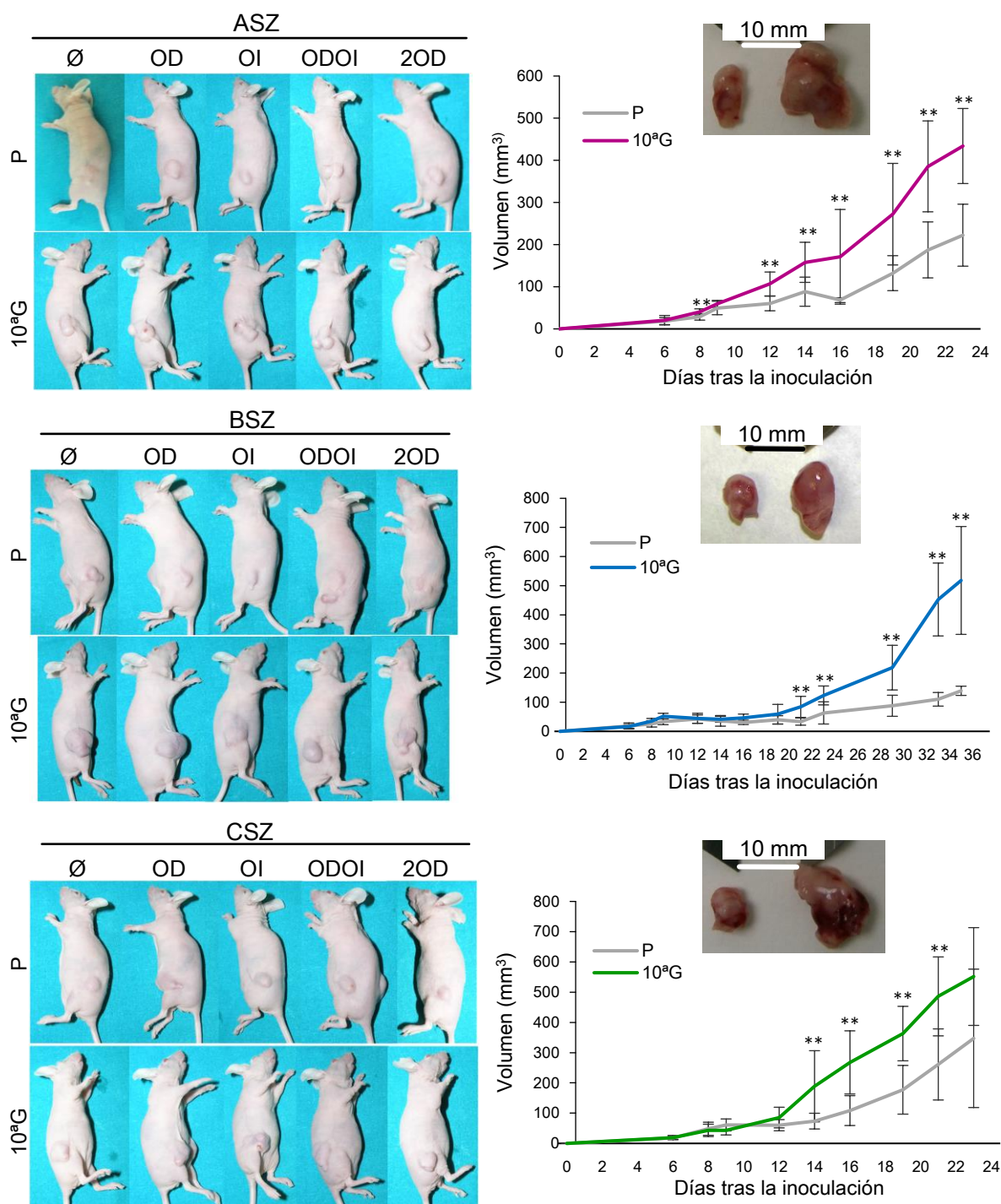
**Fig. 19** Localización y producción de protoporfirina IX (PpIX) en células de CBC murino P y 10<sup>a</sup>G. **(A)** Se evaluó la localización del fotosensibilizador PpIX tras 24 h de incubación con su precursor MAL (0,3 mM ASZ; 0,4 mM BSZ; 0,2mM CSZ), mediante microscopía de fluorescencia bajo luz de excitación UVA, comprobando la integridad celular mediante contraste de fases (CF). En todas las líneas, la PpIX mostró localización a nivel de membrana celular. Además, en ASZ y BSZ P se localizó en el núcleo de algunas células (asterisco). En CSZ 10<sup>a</sup>G se pudo observar mayor señal en la población de células poligonales (+) que en las alargadas (flecha). **(B)** La producción de PpIX evaluada por citometría de flujo tras 5 y 24 h de incubación con las concentraciones de MAL indicadas, no reveló diferencias significativas para ninguna de las condiciones evaluadas, excepto en CSZ tras 24 h, donde la producción de PpIX fue menor en las 10<sup>a</sup>G que en la población P. (\*:  $P < 0,1$ ).

Las células P se inocularon mediante inyección subcutánea en el flanco izquierdo del ratón y las 10<sup>a</sup>G en el derecho procediéndose a valorar la formación de tumores y el tamaño de los mismos con el tiempo transcurrido después de la inoculación. Como puede apreciarse en la **Fig. 20**, todas las poblaciones celulares, tanto P como 10<sup>a</sup>G, fueron capaces de generar tumores en todos los animales. Las líneas ASZ y CSZ generaron los tumores de forma rápida, alcanzando el tamaño máximo estimado de unos 500 mm<sup>3</sup> de media, a los 23 días de la inoculación. Sin embargo, los tumores inducidos por la línea BSZ se formaron más lentamente, siendo necesario realizar un seguimiento de 35 días hasta que alcanzaron el tamaño máximo indicado.

En las tres líneas celulares, los tumores desarrollados por las 10<sup>a</sup>G eran de mayor tamaño que sus correspondientes P ( $P<0,05$ ). ASZ mostró diferencias entre ambas poblaciones desde el día 8 tras la inoculación; las células P llegaron a generar tumores de unos 200 mm<sup>3</sup> de volumen, mientras que los inducidos por la 10<sup>a</sup>G alcanzaron un volumen superior a 400 mm<sup>3</sup> de media, con una distribución de tamaños de tumores entre los distintos individuos similar en ambos casos. En BSZ se observaron diferencias significativas desde el día 21; las P alcanzaron un volumen medio de unos 150 mm<sup>3</sup>, con homogeneidad de tamaños entre los diferentes animales, mientras que las 10<sup>a</sup>G generaron tumores de unos 500 mm<sup>3</sup> de volumen medio pero con tamaños heterogéneos entre los distintos individuos. En la línea CSZ se observaron diferencias significativas desde el día 14, mientras que en el día 23 no se obtuvieron diferencias estadísticas entre ambas líneas, a pesar de alcanzar volúmenes medios de 350 mm<sup>3</sup> en las P y 550 mm<sup>3</sup> en las 10<sup>a</sup>G. De estos resultados podemos concluir que las ASZ generaron tumores de menor tamaño; las BSZ, pese a su lento desarrollo, mostraron la mayor diferencia entre las poblaciones P y 10<sup>a</sup>G; y las CSZ, tanto P como 10<sup>a</sup>G, generaron tumores de mayor tamaño.

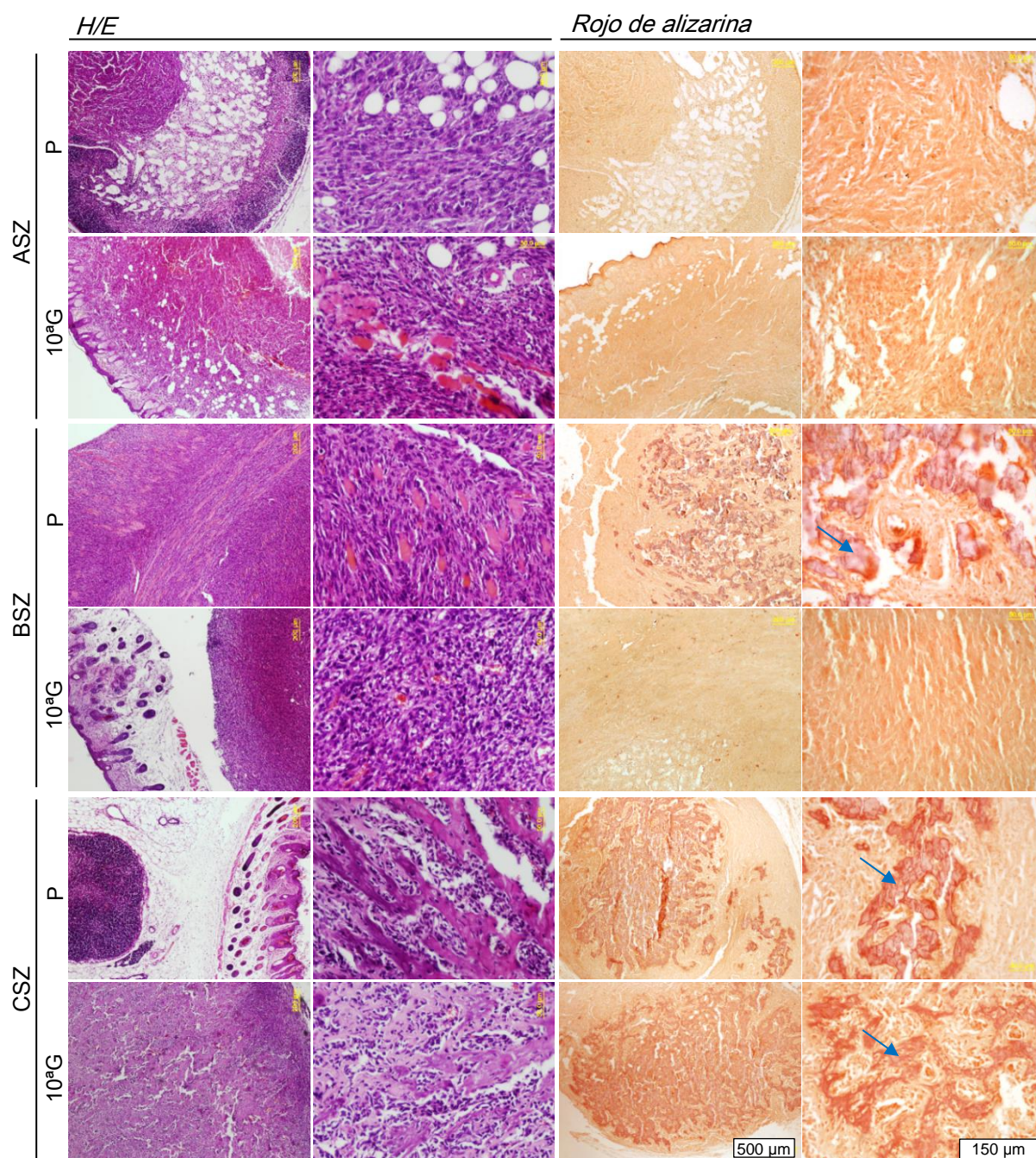
#### 4.1.2.6.2. Estudio histológico de los tumores murinos

Tras el sacrificio de los ratones, se extirparon los tumores y se procesaron para su evaluación morfológica mediante tinción con H/E o con Rojo de Alizarina (**Fig. 21**). La valoración de las preparaciones histológicas teñidas con H/E fue realizada por el patólogo Miguel Ángel Marigil del Hospital San Jorge (Huesca). Las neoplasias generadas a partir de las células ASZ P y 10<sup>a</sup>G presentaron dos tipos de patrón histológico: uno mixto, constituido por células fusiformes tipo fibrosarcoma y células con morfologías tipo osteosarcoma y otro constituido únicamente por células fusiformes. Las células BSZ y CSZ P desarrollaron tumores de similar composición, con células fusiformes y zonas de tipo osteosarcoma. Las BSZ 10<sup>a</sup>G formaron tumores que presentaban sólo células con morfología fusiforme y, en la mitad, aparecieron áreas de tipo hemangiopericitomatoso



**Fig. 20** Ensayo de tumorigenicidad de las células P y 10<sup>a</sup>G en ratones inmunosuprimidos. Se inocularon 1,5x10<sup>6</sup> células en Matrigel® por flanco, en el izquierdo las P y en el derecho las 10<sup>a</sup>G. Se utilizaron 5 ratones por línea celular. El volumen tumoral se valoró hasta que los tumores alcanzaron un volumen medio máximo de 500 mm<sup>3</sup>. En las tres líneas, la 10<sup>a</sup>G generó tumores significativamente mayores que las células P de las que proceden. BSZ desarrolló los tumores más lentamente que ASZ y CSZ. Se indica el individuo con Ø, OD; OI, ODOI y 2OD. (\*\*:  $P < 0,05$ ).





**Fig. 21** Análisis histológico de los tumores murinos generados por inoculación de ASZ, BSZ y CSZ (P y  $10^6$ G). La caracterización morfológica de los tumores se realizó mediante tinción con H/E. Los tumores generados a partir de las células P de las tres líneas, y de ASZ  $10^6$ G, en general, presentaron un patrón histológico mixto con células fusiformes tipo fibrosarcoma y regiones de tipo osteosarcoma. Sin embargo, los tumores desarrollados a partir de las BSZ  $10^6$ G únicamente presentaban células fusiformes y, 2/4 presentaron áreas de tipo hemangiopericitomatoso. Los procedentes de CSZ  $10^6$ G mostraban morfología fusiforme, tipo osteosarcoma y tipo hemangiopericitomatoso. Todos presentaban invasión del músculo y del tejido adiposo. Se detectó osteoide calcificado mediante la tinción con rojo de alizarina en los tumores generados a partir las células BSZ P, CSZ P y CSZ  $10^6$ G (flechas).

(con abundante vascularización). Los procedentes de CSZ 10<sup>a</sup>G mostraban los tres tipos de morfología descritos: fusiforme, osteosarcoma y hemangiopericitomatoso. En general, en todos los tumores generados, tanto a partir de las células P como 10<sup>a</sup>G, se observó invasión del músculo y del tejido adiposo, sin presencia de inflamación.

Mediante la tinción con rojo de alizarina se apreció que los tumores generados a partir de las BSZ P, CSZ P y CSZ 10<sup>a</sup>G formaban osteoide calcificado típico del proceso de diferenciación osteogénica. Dicho osteoide, sin embargo, no se observó en los tumores formados a partir de las poblaciones ASZ P, ASZ 10<sup>a</sup>G y BSZ 10<sup>a</sup>G.

#### 4.1.2.6.3. Morfología de las células obtenidas a partir de tumores murinos

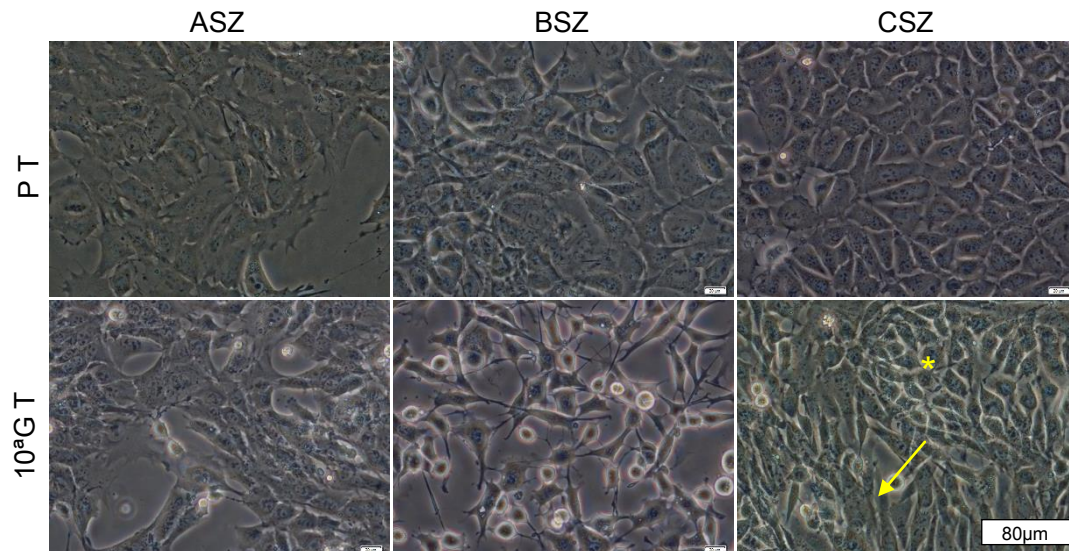
Los tumores extirpados se re-cultivaron *in vitro* mediante explante. Las células obtenidas se denominaron T y cada una de las poblaciones: parental tumor (P T) y 10<sup>a</sup>G tumor (10<sup>a</sup>G T). El análisis de su morfología mediante microscopía de CF se muestra en la **Fig. 22**. La evaluación de las poblaciones celulares puso de relieve el alargamiento de las dos poblaciones T de ASZ respecto a las células originales (P y 10<sup>a</sup>G). El cambio más relevante se observó en BSZ, cuya población 10<sup>a</sup>G T mostraba una morfología espinosa (dendrítica), mientras que las BSZ 10<sup>a</sup>G, antes de la inoculación, presentaban morfología poligonal. Por último, en CSZ T no se observaron cambios llamativos respecto a las líneas celulares originales, las células P T conformaban una única población poligonal y en los cultivos 10<sup>a</sup>G T se apreciaron dos poblaciones diferenciadas, una poligonal y otra fibroblastoide.

#### 4.1.2.7. Confirmación genética

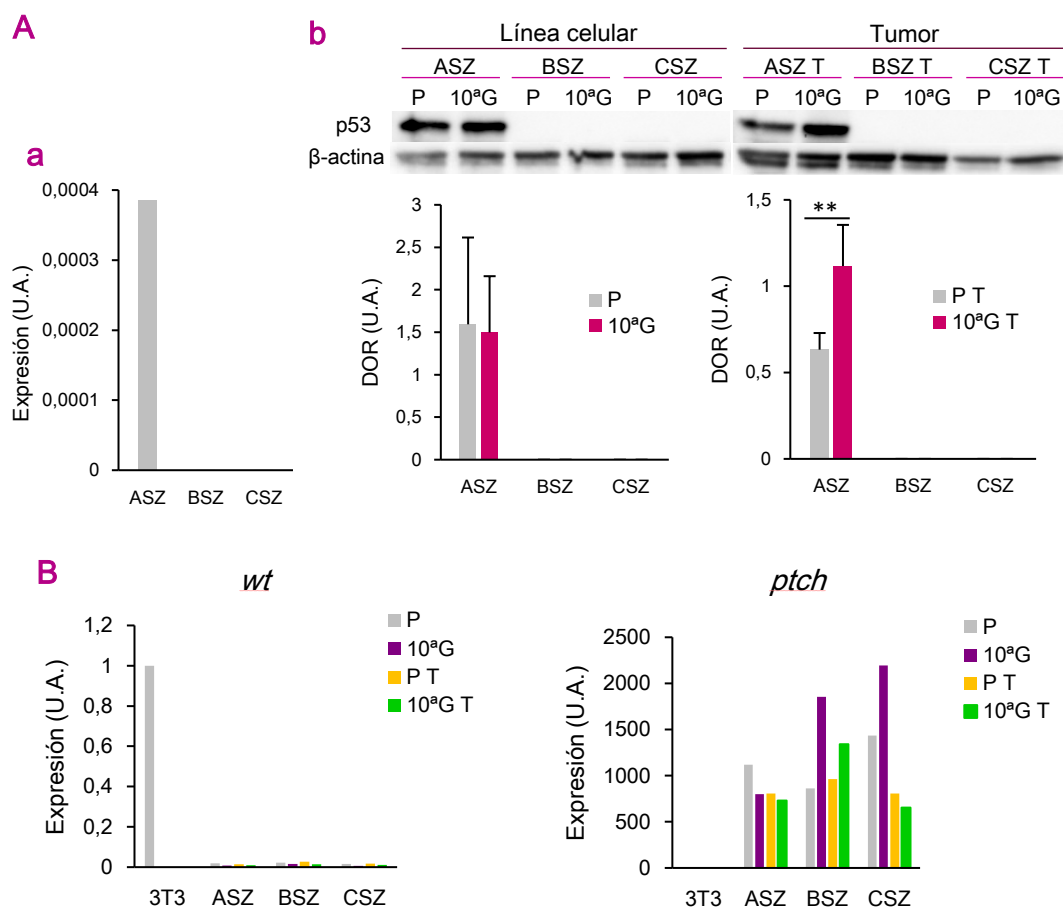
La expresión de *p53* se evaluó mediante RT-PCR en las poblaciones P de las tres líneas (**Fig. 23 Aa**), comprobándose que sólo ASZ presentaba expresión del gen. El análisis a nivel de proteína mediante WB (**Fig. 23 Ab**) confirmó que sólo se expresaba en las poblaciones de ASZ: no se apreciaron diferencias entre P y 10<sup>a</sup>G pero sí se observó un claro incremento de la misma en 10<sup>a</sup>G T respecto a P T ( $P < 0,05$ ).

La evaluación de la expresión del gen *ptch* mediante RT-PCR (**Fig. 23 B**), indicó que todas las poblaciones celulares poseían sólo una copia mutada del mismo (*ptch*) y carecían de la copia *wild type* (*wt*) (So *et al.*, 2006). Como control positivo se emplearon fibroblastos murinos 3T3 que poseen ambas copias *wt* del gen.





**Fig. 22 Morfología de las poblaciones P T y 10ª G T.** Mediante microscopía de CF se pudo observar que la morfología de ASZ 10ª G T era más alargada que la de sus P T. El cambio más relevante se apreció en BSZ; la población 10ª G T mostró una morfología dendrítica, a diferencia de sus P T, más poligonales. En CSZ P sólo se apreciaron células poligonales, mientras en 10ª G T se observaron dos poblaciones diferenciadas, una poligonal (asterisco) y otra fibroblastoide (flecha).



**Fig. 23 Expresión de p53 y ptch.** (Aa) Mediante RT-PCR, se analizó la expresión de p53 en las poblaciones P de ASZ, BSZ y CSZ. Sólo se detectó en la línea ASZ. (Ab) La cuantificación de p53 mediante WB en todas las poblaciones, confirmó que la proteína sólo se expresaba en las correspondientes a ASZ. Su expresión se incrementó significativamente en 10ª G T respecto a P T. (B) El análisis de la expresión del gen *ptch* mediante RT-PCR, confirmó que sólo la copia mutada se expresaba en todas las poblaciones. Como control positivo de la copia *wild type* (*ptch wt*) se emplearon fibroblastos murinos 3T3. Se muestran los datos relativizados a las células 3T3. (\*\*:  $P < 0,05$ ).

#### 4.1.2.8. Evaluación de proteínas implicadas en progresión tumoral

En la progresión tumoral las células pueden perder sus características epiteliales y adquirir un fenotipo mesenquimal que le confiere propiedades invasivas en un proceso de TEM. Este proceso incluye cambios fenotípicos como la pérdida de la adhesión célula-célula mediada por E-cad o el incremento de la expresión de marcadores mesenquimales como vimentina o N-cad. El proceso de TEM está promovido, entre otros factores, por la ruta Wnt/ $\beta$ -cat (Nakamura y Tokura, 2011; Li y Li, 2015).

En este sentido, se valoró la expresión de algunos de los marcadores citados, implicados en movilidad e invasión celular, en las diferentes poblaciones celulares utilizadas en este trabajo. Asimismo, se analizaron algunas de las proteínas de la ruta Wnt/ $\beta$ -cat. La expresión y localización de las proteínas analizadas se describen a continuación (**Fig. 24-28**) y se resumen en las **Tablas 5 y 6**.

##### 4.1.2.8.1. E-cadherina

La proteína E-cad es una glicoproteína transmembrana que media la adhesión célula-célula dependiente de calcio. Por su dominio citoplasmático se une a  $\beta$ -cat. Su función se pierde de forma total o parcial en la progresión a la malignidad de numerosos carcinomas (Jeanes *et al.*, 2008; Canel *et al.*, 2013).

Como muestra la **Fig. 24 A**, en ASZ, E-cad sólo se expresaba en la membrana de las P T y de forma difusa en el citoplasma tanto de P T como de  $10^a$ G T. En BSZ se expresaba en la membrana y difusa en el citoplasma de P,  $10^a$ G y P T, mientras que en  $10^a$ G T sólo aparecía difusa en el citoplasma. En CSZ P y P T se observó una señal intensa en la membrana y difusa en el citoplasma; en  $10^a$ G y  $10^a$ G T, las poblaciones poligonales mostraban el mismo patrón descrito y las poblaciones fibroblastoides no expresaban la proteína. La cuantificación de la expresión de E-cad mediante WB (**Fig. 24 B**), confirmó estos resultados: en ASZ P y  $10^a$ G no se detectaba expresión, mientras que en las P T sí se expresaba y más que en  $10^a$ G T ( $P < 0,01$ ); BSZ y CSZ siguieron la misma tendencia, las poblaciones resistentes  $10^a$ G y  $10^a$ G T expresaron significativamente menos E-cad que sus correspondientes P y P T.

La expresión a nivel de ARNm, determinada mediante RT-PCR (**Fig. 24 C**), permitió comprobar que las poblaciones  $10^a$ G y  $10^a$ G T de BSZ y CSZ mostraban una menor expresión de E-cad que sus respectivas P y P T ( $P < 0,05$ ). En ASZ sólo se detectó en su población P T.

Marcador	ASZ			
	P	10°G	P T	10°G T
E-cad	No expresión	No expresión	Citoplasma y membrana	Citoplasma
N-cad	Uniones célula-célula	Uniones célula-célula (más intensa)	Citoplasma	Citoplasma
vimentina	Citoplasma	Citoplasma	Citoplasma	Citoplasma
β-cat	Citoplasma y membrana	Citoplasma y membrana	Citoplasma, membrana y núcleo	Citoplasma y membrana
β-cat activa	No expresión	No expresión	Uniones célula-célula	No expresión
Gsk3β	Citoplasma	Citoplasma	Citoplasma	Citoplasma
Sox2	Punteado perinuclear	Punteado perinuclear	Citoplasma	Citoplasma y núcleo
Oct4	Punteado perinuclear	Punteado perinuclear	Punteado perinuclear	Punteado perinuclear
Nanog	Citoplasma	Citoplasma	Citoplasma	Citoplasma

Marcador	BSZ			
	P	10°G	P T	10°G T
E-cad	Citoplasma y membrana	Citoplasma y membrana	Citoplasma y membrana	Citoplasma
N-cad	Citoplasma y membrana (algunas células)	Citoplasma y membrana (algunas células)	Citoplasma y uniones célula-célula	Citoplasma
vimentina	Citoplasma	Citoplasma	Citoplasma	Citoplasma
β-cat	Citoplasma y membrana	Citoplasma y membrana	Citoplasma y membrana	Citoplasma, membrana y núcleo (menos intensa)
β-cat activa	Uniones célula-célula y núcleo	Uniones célula-célula	Uniones célula-célula	Punteado nuclear
Gsk3β	Citoplasma	Núcleo	Citoplasma	Citoplasma
Sox2	Citoplasma	Citoplasma	Citoplasma	Citoplasma
Oct4	Punteado perinuclear	Punteado perinuclear	Punteado perinuclear	Punteado perinuclear
Nanog	Citoplasma y zona nuclear	Citoplasma y zona nuclear	Citoplasma y zona nuclear	Citoplasma y zona nuclear

Marcador	CSZ			
	P	10°G	P T	10°G T
E-cad	Citoplasma y membrana	Citoplasma y membrana (células poligonales)	Citoplasma y membrana	Citoplasma y membrana (células poligonales)
N-cad	Citoplasma y uniones célula-célula	Citoplasma y uniones célula-célula	Citoplasma	Citoplasma
vimentina	Citoplasma	Citoplasma	Citoplasma	Citoplasma
β-cat	Citoplasma y membrana	Citoplasma y membrana (menos intensa en fibroblastoides)	Citoplasma y membrana	Citoplasma y membrana (menos intensa en fibroblastoides)
β-cat activa	Uniones célula-célula	Punteado nuclear	Uniones célula-célula	Uniones célula-célula (menos intensa)
Gsk3β	Citoplasma	Citoplasma (menos intensa en fibroblastoides)	Citoplasma	Citoplasma
Sox2	Citoplasma	Citoplasma	Citoplasma y núcleo	Citoplasma y nuclear (más intensa en fibroblastoides)
Oct4	Punteado perinuclear	Punteado perinuclear	Punteado perinuclear	Punteado perinuclear
Nanog	Citoplasma	Citoplasma	Citoplasma y núcleo	Citoplasma y núcleo

**Tabla 5** Patrón de expresión y localización de proteínas relacionadas con la progresión tumoral analizadas mediante IF en las líneas ASZ, BSZ y CSZ de CBC murino. Se muestra un resumen de los resultados obtenidos mediante IF de la localización y el patrón de expresión de las proteínas E-cad, N-cad, vimentina, β-cat, β-cat activa y Gsk3β, implicadas en progresión tumoral, y de los marcadores de células madre Sox2, Oct4 y Nanog.

Línea	Marcador	10 <sup>a</sup> G respecto a P	10 <sup>a</sup> G T respecto a P T
ASZ	E-cad	-	↓ (sólo en P T)
	N-cad	↑	No sig. ↑
	β-cat	=	=
	Gsk3β	↑	↑
	Abcg2	=	↑ (muy baja en P T)
	Aldh1	No sig. ↓	No sig. ↓
	Sox2	No sig. ↑	↑
	Oct4	No sig. ↑	No sig. ↑
	Nanog	No sig. ↓	No sig. ↓
BSZ	E-cad	↓	↓
	N-cad	↓	↑
	β-cat	↓	↓
	Gsk3β	No sig. ↓	No sig. ↓
	Abcg2	↓	↓
	Aldh1	No sig. ↓	No sig. ↓
	Sox2	↓	No sig. ↓
	Oct4	No sig. ↑	No sig. ↑
	Nanog	No sig. ↑	No sig. ↑
CSZ	E-cad	↓	↓
	N-cad	=	=
	β-cat	↓	↓
	Gsk3β	↓	No sig. ↓
	Abcg2	↓	↓
	Aldh1	No sig. ↓	No sig. ↓
	Sox2	No sig. ↑	↑
	Oct4	No sig. ↑	No sig. ↑
	Nanog	No sig. ↑	No sig. ↑

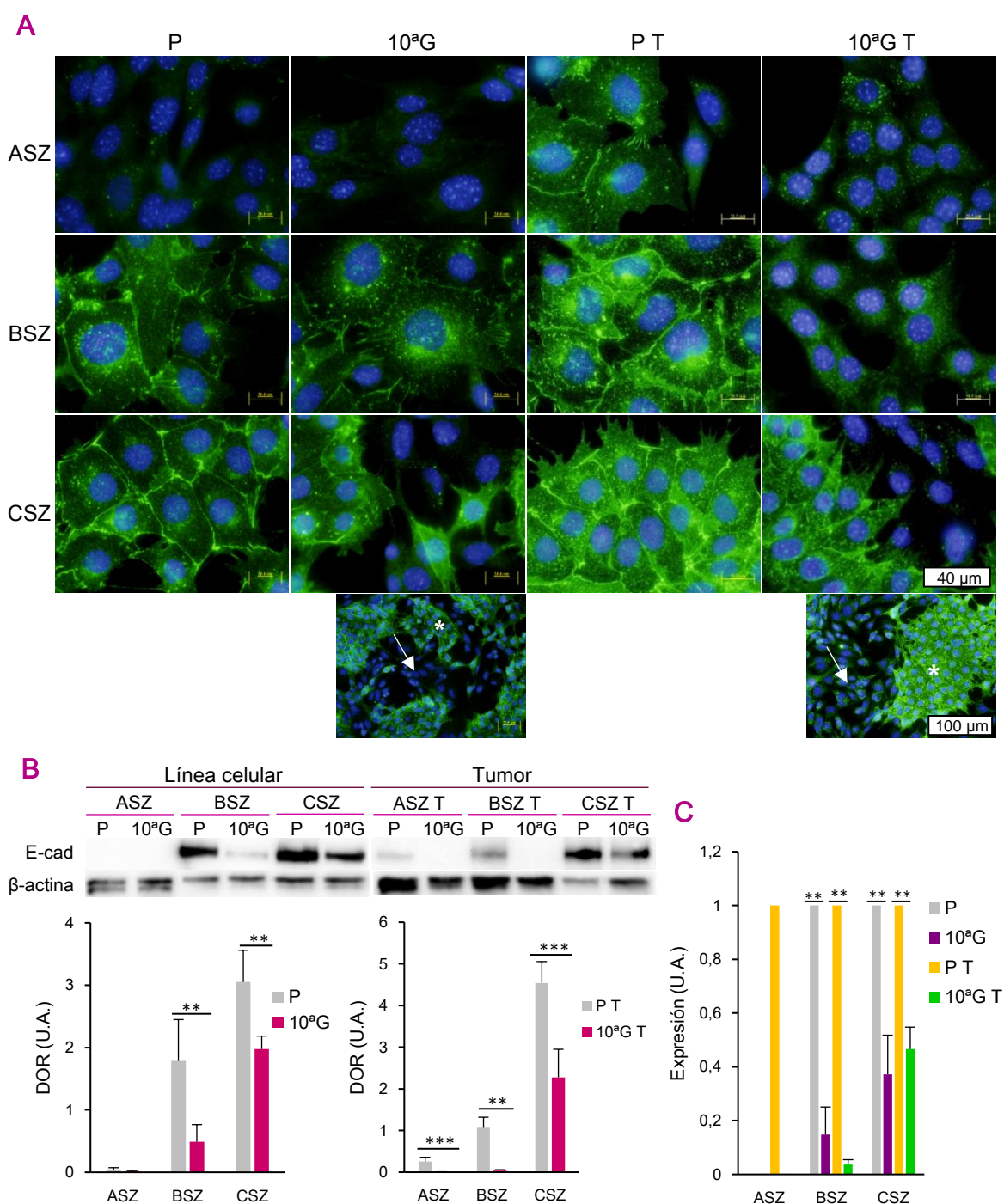
**Tabla 6** Diferencias de expresión de proteínas relacionadas con la progresión tumoral entre las poblaciones resistentes y sus respectivas parentales de las líneas de CBC murino ASZ, BSZ y CSZ analizada mediante WB y/o RT-PCR. Se muestran las diferencias de expresión entre la población 10<sup>a</sup>G y su P, y entre la 10<sup>a</sup>G T y su P T para cada línea celular. Los análisis de expresión se realizaron mediante WB y/o RT-PCR; se evaluaron los marcadores E-cad, N-cad, β-cat y Gsk3β, implicados en progresión tumoral, y los marcadores de células madre del cáncer Abcg2, Aldh1, Sox2, Oct4 y Nanog. Las flechas gruesas indican diferencias significativas, mientras que las finas indican tendencias no significativas (No sig.)

#### 4.1.2.8.2. Proteínas de tipo mesenquimal

La **N-cad** es una proteína transmembrana de adhesión dependiente de calcio, que promueve la supervivencia celular y los procesos de migración e invasión (Derycke y Bracke, 2004; Breier *et al.*, 2014).

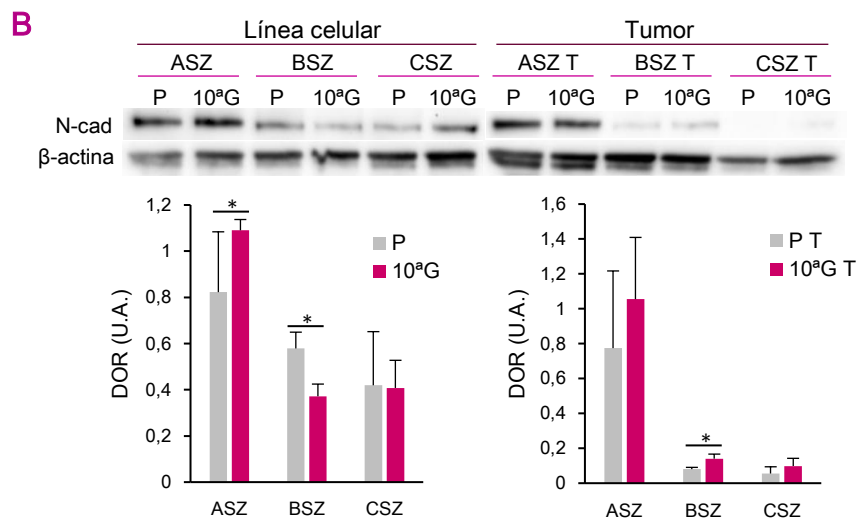
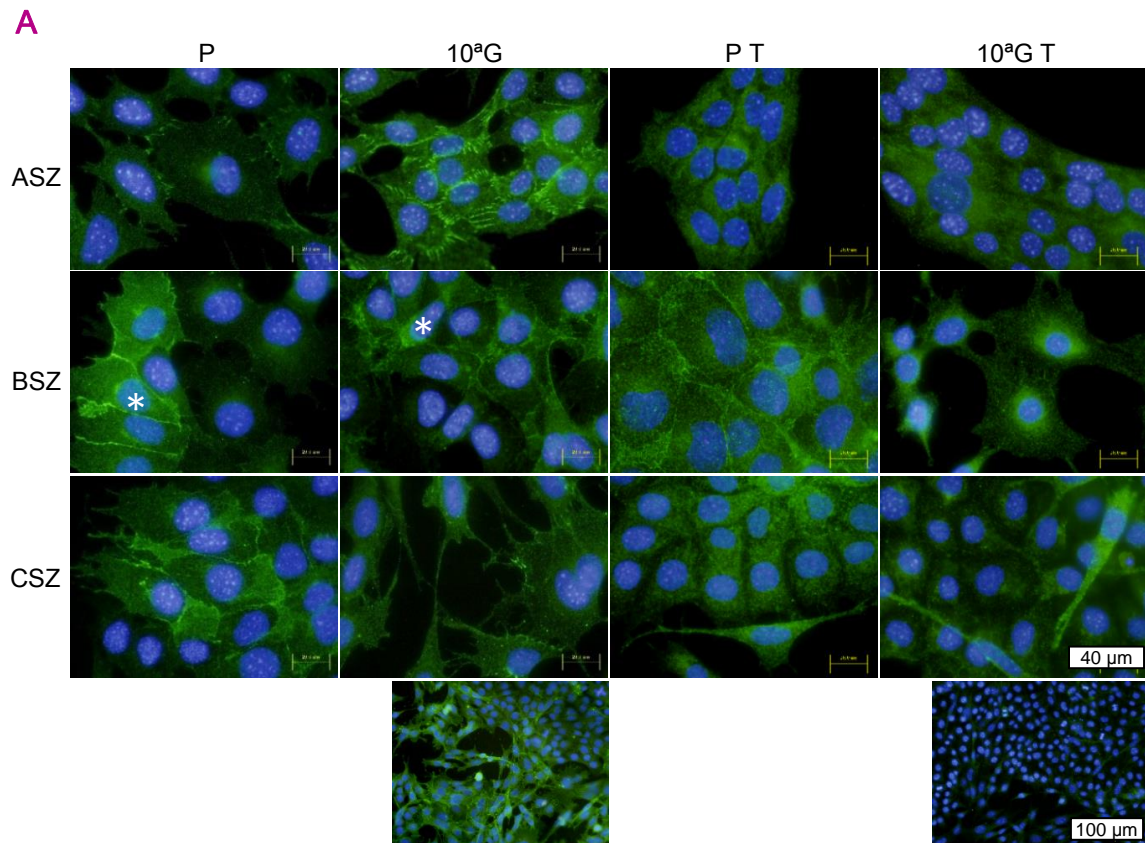
La valoración de la expresión de la proteína mediante IF (**Fig. 25 A**) reveló que ASZ P mostraba una escasa expresión a nivel de citoplasma y membrana, mientras que en 10<sup>a</sup>G se localizaba a nivel de membrana. No se encontraron diferencias entre P T y 10<sup>a</sup>G T; en ambas, únicamente se vio una señal difusa en el citoplasma. La expresión en BSZ P era variable, apareciendo células con señal citoplasmática y de membrana, y células

con marcaje exclusivo en el citoplasma; en 10<sup>a</sup>G el marcaje era similar a la de P, pero menos intensa en membrana; en las células procedentes del tumor (P T y 10<sup>a</sup>G T) la señal fue difusa en el citoplasma y pobre en la membrana de P T. Las poblaciones CSZ P y



**Fig. 24 Localización y expresión de E-cadherina.** (A) Las imágenes de IF muestran que, en ASZ, E-cad sólo se visualizó en P T (en la membrana y difusa en el citoplasma) y en 10<sup>a</sup>G T (difusa en el citoplasma). En BSZ, se observó tanto en la membrana como difusa en el citoplasma, excepto en 10<sup>a</sup>G T, que solo mostró localización citoplasmática. En CSZ P y P T, E-cad apareció en la membrana y difusa en el citoplasma; en 10<sup>a</sup>G y 10<sup>a</sup>G T en las poblaciones poligonales (asterisco) se localizó en la membrana y difusa en el citoplasma, mientras que en las poblaciones fibroblastoides (flecha) no se detectó. (B) Los resultados de WB confirmaron que ASZ P y 10<sup>a</sup>G no expresaban la proteína y que en 10<sup>a</sup>G T disminuía respecto a P T. En BSZ y CSZ se confirmó la disminución de la expresión en las poblaciones resistentes. (C) A nivel de ARNm, se representan los valores de 10<sup>a</sup>G y 10<sup>a</sup>G T relativizados a sus P y P T, respectivamente. Los resultados de RT-PCR indicaban que los niveles de expresión de E-cad en BSZ y CSZ 10<sup>a</sup>G y 10<sup>a</sup>G T eran inferiores a los de sus P y P T. En ASZ sólo se detectó expresión en P T. (\*\*:  $P < 0,05$ ; \*\*\*:  $P < 0,01$ ).





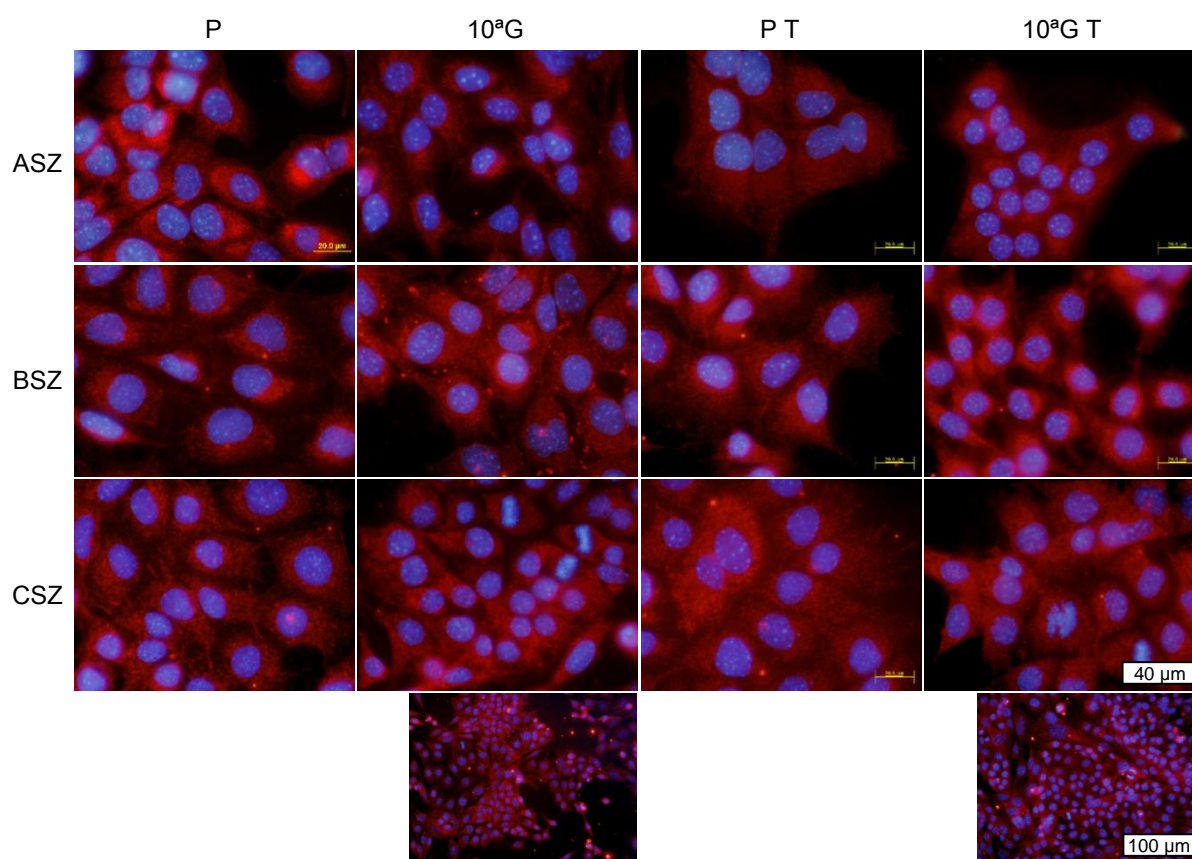
**Fig. 25 Localización y expresión de N-cadherina.** (A) El análisis por IF indicó que, en ASZ la señal de N-cad se localizó en las uniones célula-célula de P y 10<sup>3</sup>G y difusa en el citoplasma de P T y 10<sup>3</sup>G T. En BSZ P y 10<sup>3</sup>G la proteína se expresó en la membrana y el citoplasma de algunas células (asterisco); en P T en el citoplasma y las uniones entre células, y en 10<sup>3</sup>G T únicamente en el citoplasma. En CSZ P y 10<sup>3</sup>G la señal estaba en las uniones célula-célula y en el citoplasma, pero en P T y 10<sup>3</sup>G T sólo se vio difusa en el citoplasma. (B) En la cuantificación de proteína por WB, ASZ 10<sup>3</sup>G incrementó la expresión de la proteína respecto a su P, pero no se apreciaron cambios significativos a nivel de tumor. En BSZ disminuyó la expresión en 10<sup>3</sup>G respecto a P, pero aumentó en 10<sup>3</sup>G T respecto a P T. No se observaron diferencias significativas en CSZ. (\*:  $P < 0,1$ ).

10<sup>3</sup>G parecían presentar una señal débil en membrana y citoplasma, a diferencia de P T y 10<sup>3</sup>G T, en las que sólo se pudo apreciar fluorescencia intracelular difusa. La evaluación mediante WB (**Fig. 25 B**) mostró una expresión significativamente menor en ASZ P que



en su 10<sup>a</sup>G ( $P<0,1$ ), pero no se detectaron cambios significativos en las poblaciones procedentes de tumor. Sin embargo, BSZ P presentó una mayor expresión de N-cad que su 10<sup>a</sup>G ( $P<0,1$ ), mientras que en las poblaciones procedentes de tumor sucedía lo contrario. En CSZ no se observaron cambios significativos ni entre P y 10<sup>a</sup>G, ni entre P T y 10<sup>a</sup>G T.

La **vimentina** es una proteína de la familia de los filamentos intermedios que se ha relacionado con la TEM y, por tanto, con el desarrollo y la progresión tumoral; su sobreexpresión se asocia con un fenotipo invasivo (Satelli y Li, 2011). La valoración de la expresión de esta proteína se realizó mediante IF (Fig. 26), ya que no se detectó expresión mediante WB (datos no mostrados). Todas las poblaciones P y 10<sup>a</sup>G presentaron una señal de fluorescencia difusa en el citoplasma, sin diferencias notables entre los diferentes tipos celulares.



**Fig. 26 Localización y expresión de vimentina.** Como se aprecia en las imágenes de IF, en todas las poblaciones de ASZ, BSZ y CSZ, se observó una señal de la proteína difusa en el citoplasma.

#### 4.1.2.8.3. Proteínas de la ruta Wnt/ $\beta$ -catenina

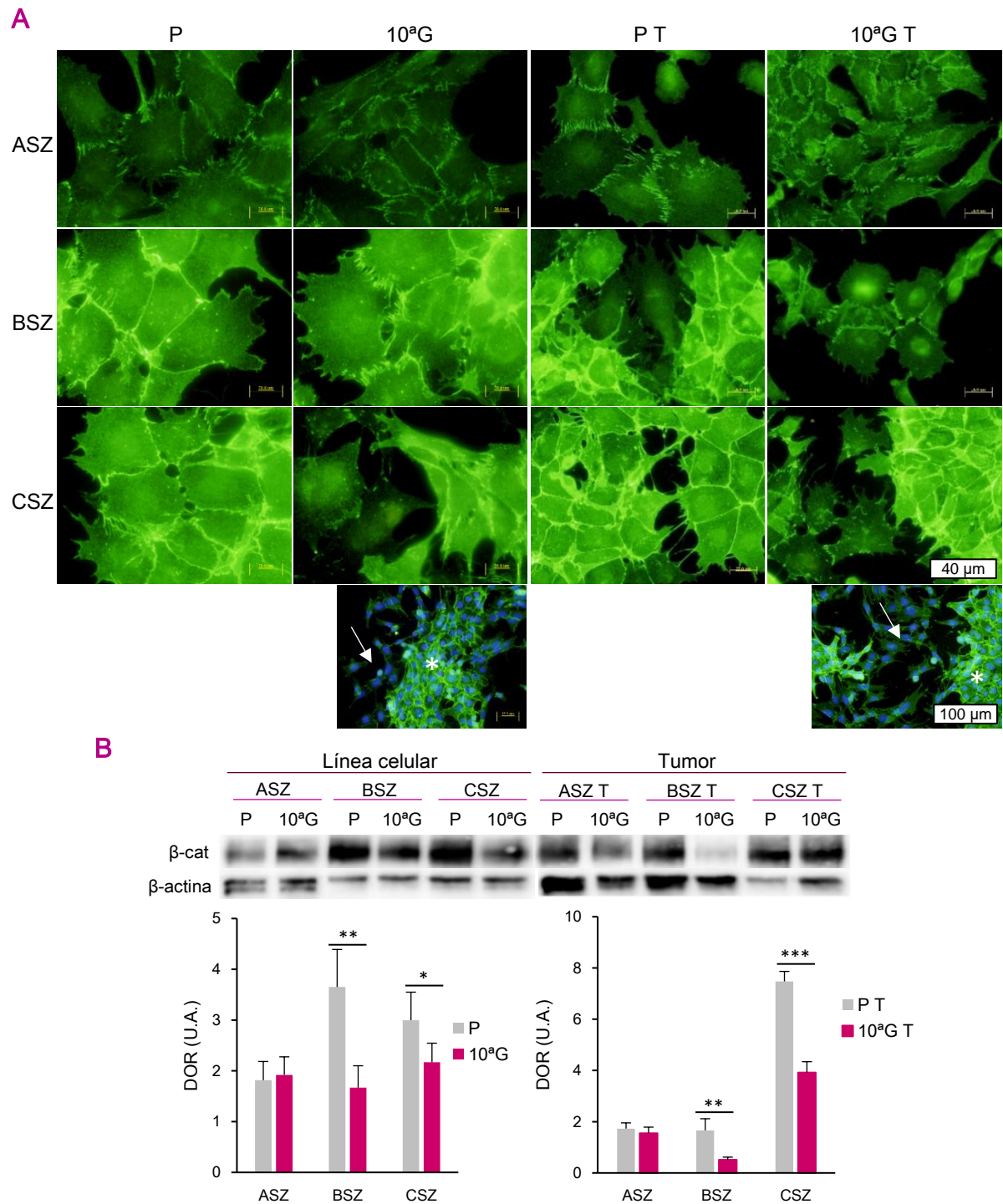
La  **$\beta$ -cat** citoplasmática actúa a nivel de adhesión, uniendo la E-cad al citoesqueleto de actina mediante moléculas intermedias, y además actúa como factor de transcripción de la ruta Wnt/ $\beta$ -cat (Stemmler, 2008; Saito-Díaz *et al.*, 2013).

Se estudió su localización mediante IF (**Fig. 27 A**). En todas las poblaciones se pudo observar una señal difusa en el citoplasma e intensa en la membrana plasmática, siendo más llamativa en las líneas BSZ y CSZ. Además, en ASZ P T se apreció una señal más específica en el núcleo. En cuanto a BSZ, la 10<sup>a</sup>G T presentó una señal más leve que P, 10<sup>a</sup>G y P T, y concentrada en el núcleo. En CSZ P y P T la señal era intensa, tanto a nivel de membrana como de citoplasma. En CSZ 10<sup>a</sup>G y 10<sup>a</sup>G T la población poligonal mostraba una señal más intensa que la de la población fibroblastoide. La cuantificación de la proteína por WB (**Fig. 27 B**) corroboró estos resultados obtenidos mediante IF: en ASZ no se observaron cambios de expresión de proteína total entre P y 10<sup>a</sup>G, ni entre P T y 10<sup>a</sup>G T; las poblaciones BSZ P y P T mostraron mayor expresión que 10<sup>a</sup>G y 10<sup>a</sup>G T, respectivamente ( $P<0,05$ ); y en CSZ también fue mayor en P y P T que en 10<sup>a</sup>G ( $P<0,1$ ) y 10<sup>a</sup>G T ( $P<0,01$ ).

Asimismo, se evaluó mediante IF la localización de la proteína  $\beta$ -cat en su forma activa (**Fig. 28**). La  $\beta$ -cat activa (no fosforilada) se localiza en la membrana, dónde actúa en la adhesión célula-célula, y en el núcleo, actuando como factor de transcripción en la ruta Wnt/ $\beta$ -cat. En la línea ASZ sólo se detectó señal en las P T, la cual era tenue y localizada en la periferia celular. En BSZ se apreció señal en la membrana de las células P, 10<sup>a</sup>G y P T, mientras que en 10<sup>a</sup>G T se detectó únicamente un punteado nuclear. En cuanto a CSZ las poblaciones P y P T mostraron fluorescencia en membrana; en 10<sup>a</sup>G sólo se detectó en el núcleo, en 10<sup>a</sup>G T en membrana pero menos intensa que en P T y aparentemente, la población de morfología poligonal mostró mayor expresión que la fibroblastoide.

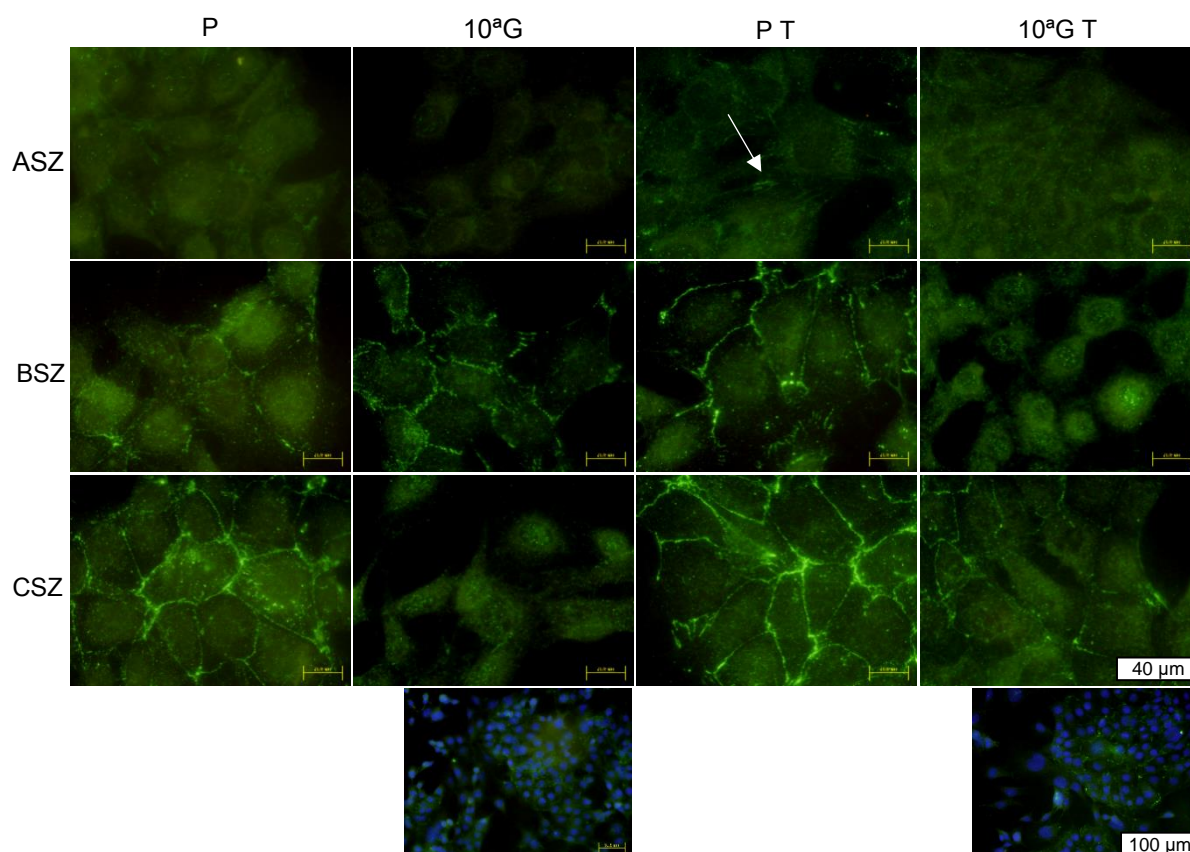
Otra de las proteínas estudiadas e involucradas en la ruta Wnt/ $\beta$ -cat es **Gsk3 $\beta$** . Se trata de una quinasa que forma parte del complejo responsable de la eliminación de la proteína  $\beta$ -cat ([Saíto-Díaz et al., 2013](#)).

La valoración de la expresión de esta proteína mediante IF (**Fig. 29 A**) reveló que se localizaba de forma difusa en el citoplasma de todas las células y sólo en BSZ 10<sup>a</sup>G se apreció en el núcleo. En CSZ 10<sup>a</sup>G se detectó una señal más intensa en la población de células poligonales en comparación con las de morfología alargada, mientras que 10<sup>a</sup>G T mostraba una expresión uniforme en ambas poblaciones. La cuantificación de la expresión mediante WB (**Fig. 29 B**) indicó mayor expresión en ASZ 10<sup>a</sup>G y 10<sup>a</sup>GT respecto a P y P T, respectivamente ( $P<0,1$ ). En BSZ la expresión presentó una tendencia a disminuir en 10<sup>a</sup>G y 10<sup>a</sup>G T respecto a sus P y P T, respectivamente. En CSZ se observó la misma tendencia que en BSZ, siendo significativamente menor en 10<sup>a</sup>G que en P ( $P<0,1$ ).



**Fig. 27 Localización y expresión de  $\beta$ -catenina.** (A) El análisis por IF mostró que en todas las líneas la proteína se situaba tanto a nivel de membrana como difusa en el citoplasma. En BSZ y CSZ la señal era más intensa que en ASZ. En ASZ P T y BSZ 10<sup>3</sup>G T, además, se observó su expresión en el núcleo. En cuanto a CSZ 10<sup>3</sup>G y 10<sup>3</sup>G T, la subpoblación con morfología poligonal presentó una señal intensa de  $\beta$ -cat (asterisco), mientras que en la fibroblastoide apenas se detectó expresión (flecha). El núcleo se contratiñó con DAPI. (B) La evaluación de la expresión mediante WB, apoyó las observaciones cualitativas de la IF: en ASZ la expresión en P y 10<sup>3</sup>G fue similar, mientras que en BSZ y CSZ las poblaciones resistentes mostraron una expresión significativamente menor que sus parentales. (\*:  $P < 0,1$ ; \*\*:  $P < 0,05$ ; \*\*\*:  $P < 0,01$ ).





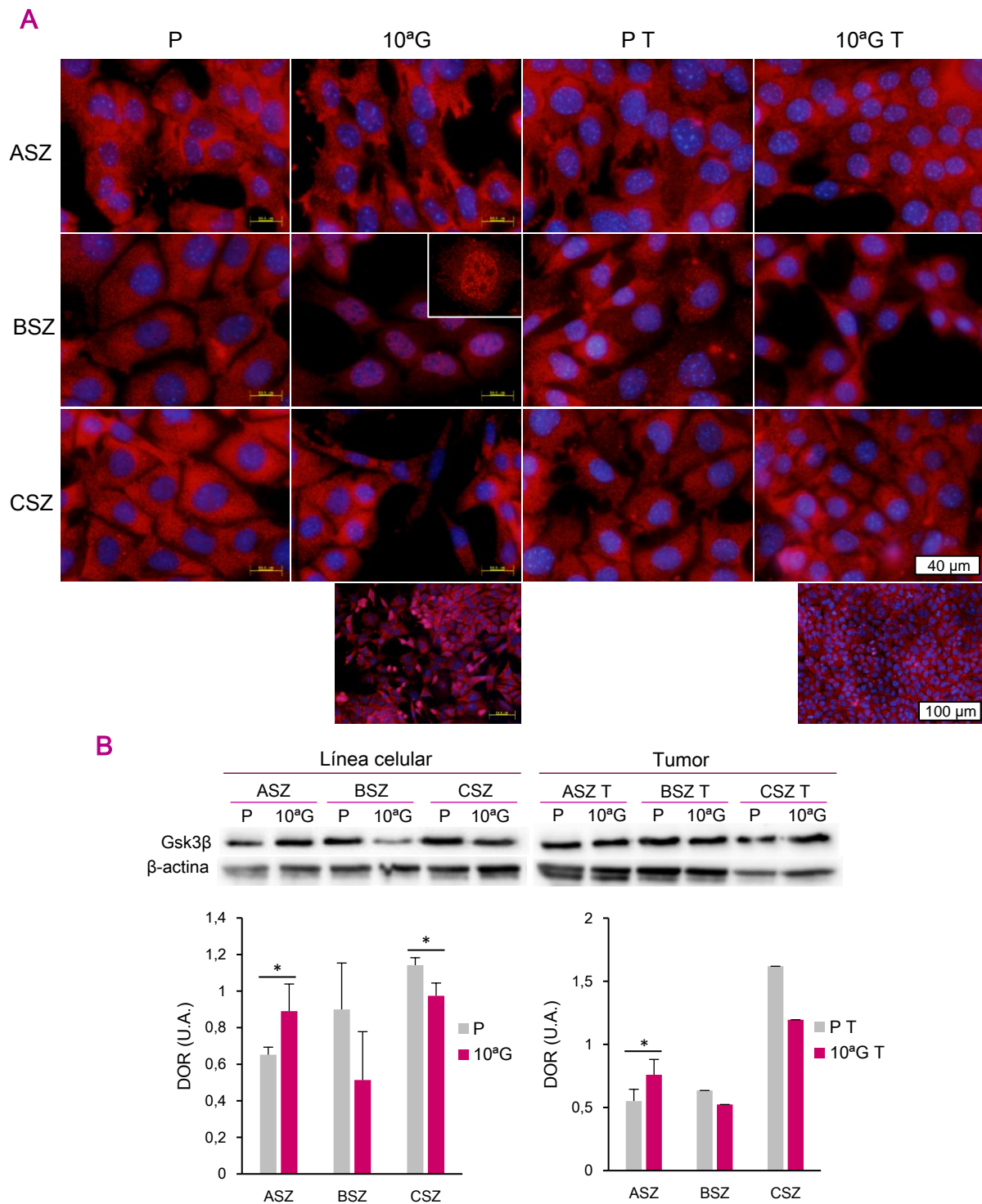
**Fig. 28 Localización y expresión de  $\beta$ -catenina activa.** En el análisis por IF, en ASZ únicamente se detectó señal de esta proteína en los extremos de las células de la población P T (flecha). En BSZ se observó  $\beta$ -cat activa en la membrana de todas las poblaciones excepto en  $10^aG$  T, en la que se detectó únicamente un punteado nuclear. En CSZ, la señal en membrana sólo se observó en P, P T y, muy ligeramente, en  $10^aG$  T, mientras que en  $10^aG$  se apreció solo punteado nuclear.

#### 4.1.2.9. Expresión de marcadores de células madre

Se ha demostrado que la resistencia a terapias anticancerígenas también está relacionada con la presencia de CMCs (Cojoc *et al.*, 2015). Por este motivo, se estudiaron algunos marcadores específicos de dichas células como Abcg2, Aldh1, Sox2, Oct4 o Nanog, con el objetivo de comprobar si su expresión aumentaba en la población de células resistentes a TFD respecto a las parentales. Los datos obtenidos se encuentran resumidos en las **Tablas 5 y 6**.

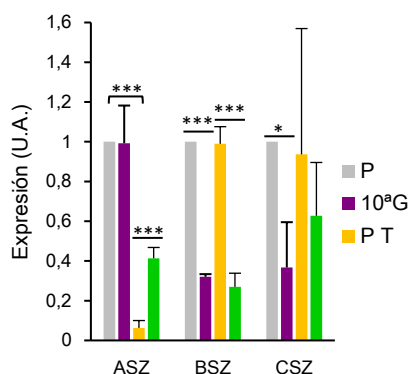
##### 4.1.2.9.1. Abcg2

La bomba de expulsión de drogas tipo MDR, Abcg2, se ha vinculado con la expulsión al exterior celular de PpIX producida por la administración exógena de ALA (Robey *et al.*, 2005; Kobuchi *et al.*, 2012). Además, se ha observado su sobreexpresión en CMCs (Ding *et al.*, 2010).



**Fig. 29 Localización y expresión de Gsk3β.** (A) Como muestra la IF, Gsk3β mostró localización citoplasmática en todas las poblaciones celulares, a excepción de BSZ 10<sup>9</sup>G, en la cual se apreció en el núcleo. En CSZ 10<sup>9</sup>G, la subpoblación poligonal presentaba una señal más intensa (asterisco) en comparación con la subpoblación fibroblastoide (flecha). (B) La cuantificación de la expresión mediante WB reveló una mayor expresión en ASZ 10<sup>9</sup>G y 10<sup>9</sup>G T respecto a P y P T, respectivamente. Sin embargo, en BSZ y CSZ la expresión mostró tendencia a disminuir en 10<sup>9</sup>G y 10<sup>9</sup>G T respecto a sus respectivas parentales. En BSZ y CSZ T se muestra la media de dos datos. (\*:  $P < 0,1$ ).

Los resultados obtenidos tras el análisis de la expresión de su ARNm mediante RT-PCR (**Fig. 30**) revelaron que no existían diferencias entre ASZ P y 10<sup>a</sup>G, pero su expresión aumentaba de forma significativa en 10<sup>a</sup>G T respecto a P T ( $P<0,05$ ). Cabe destacar que la expresión en P T era menor que en P ( $P<0,01$ ). En BSZ y CSZ disminuía significativamente en 10<sup>a</sup>G y 10<sup>a</sup>G T respecto a sus P y P T.

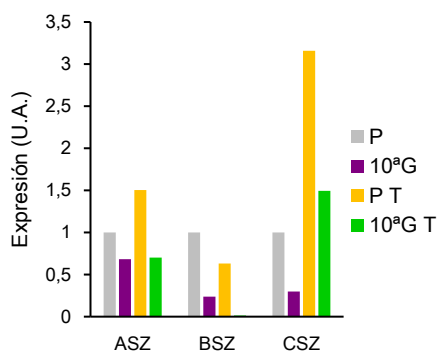


**Fig. 30** Expresión de la bomba Abcg2. Se representan los resultados del análisis por RT-PCR. Los valores se encuentran relativizados a los de P en cada una de las líneas. En ASZ la expresión disminuyó significativamente en P T respecto a P y aumentó en 10<sup>a</sup>G T respecto a P T. En BSZ disminuyó en las poblaciones resistentes respecto a las parentales. Por último, en CSZ la expresión fue significativamente menor en 10<sup>a</sup>G que en P. (\*:  $P<0,1$ ; \*\*\*:  $P<0,01$ ).

#### 4.1.2.9.2. Aldh1

La Aldh1, es una enzima necesaria para la correcta diferenciación y desarrollo de los tejidos. Además, juega un papel en la detoxificación de drogas anticancerígenas y su sobreexpresión se ha relacionado con la resistencia de las CMCs a fármacos (Tomita *et al.*, 2016).

Tras el análisis mediante RT-PCR (**Fig. 31**), se observó una disminución de su expresión en todas las 10<sup>a</sup>G y 10<sup>a</sup>G T respecto a sus correspondientes P y P T.



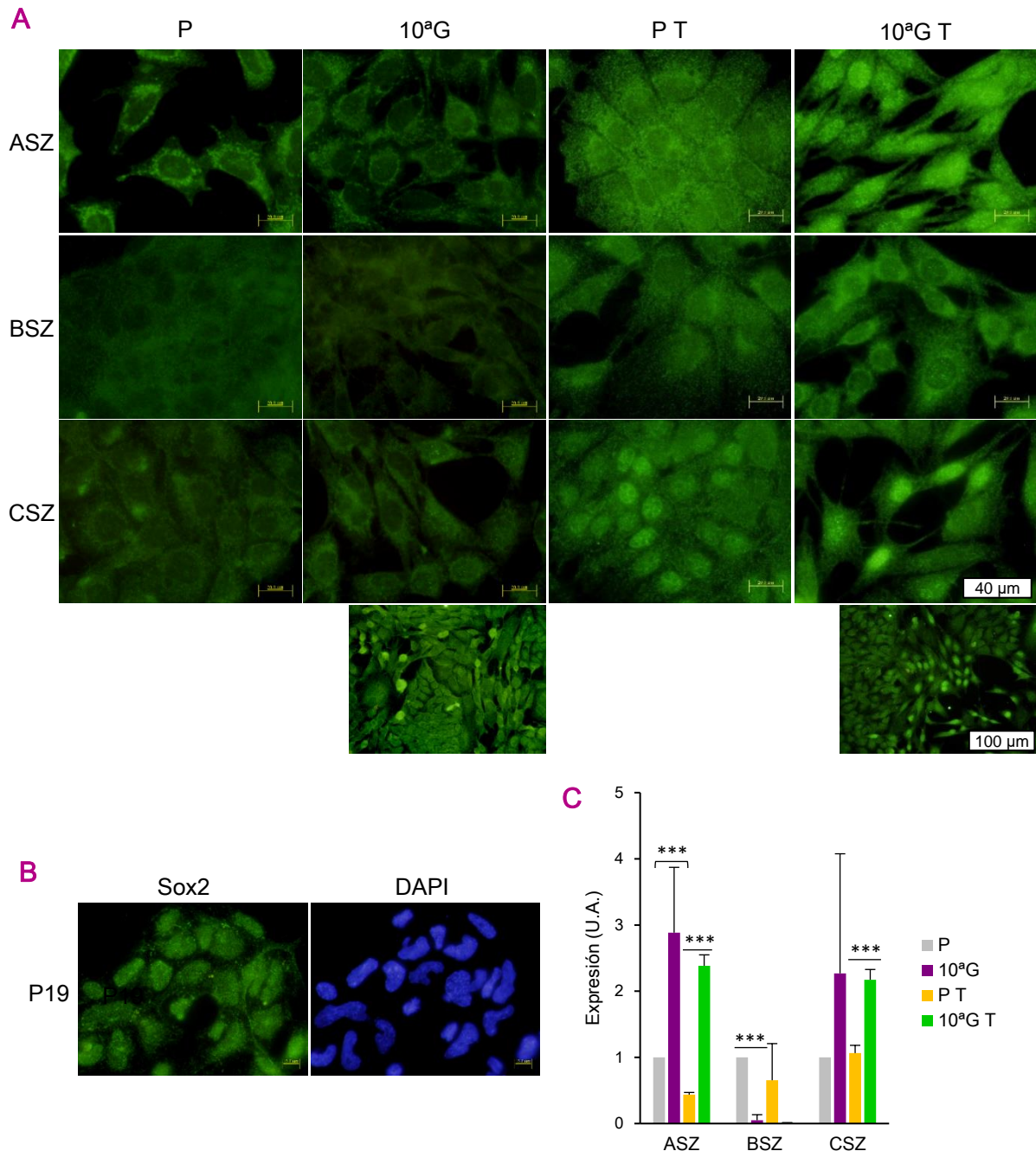
**Fig. 31** Expresión de la enzima Aldh1. Se representan los resultados del análisis por RT-PCR. Los valores se encuentran relativizados a los de P en cada una de las líneas. La expresión de Aldh1 mostró tendencia a disminuir en todas las líneas resistentes respecto a sus parentales. Se muestra la media de dos datos.

#### 4.1.2.9.3. Sox2

El factor de transcripción de alta movilidad Sox2 juega un papel fundamental en el desarrollo temprano y el mantenimiento en estado indiferenciado de las CM embrionarias. Se ha observado su sobreexpresión o amplificación genética en diversos tipos de cáncer (Liu *et al.*, 2013).

Su localización se evaluó mediante IF (**Fig. 32 A**). En ASZ P y 10<sup>a</sup>G se situó a modo de punteado perinuclear de baja intensidad, en P T el punteado se extendía por todo el citoplasma, y en 10<sup>a</sup>G T aparecía, además, localizada a nivel nuclear. En BSZ, todas las

poblaciones mostraron una leve señal difusa por todo el citoplasma. En CSZ P y 10<sup>a</sup>G se observó un punteado citoplasmático, y en CSZ P T y 10<sup>a</sup>G T se observó una señal nuclear más intensa y definida, especialmente, en las células con morfología fibroblastoide. Como control positivo de expresión de este factor de transcripción se utilizaron las células de carcinoma embrionario de ratón P19 (**Fig. 32 B**), en las cuales Sox2 se localizó a nivel nuclear.



**Fig. 32 Localización y expresión de Sox2.** (A) El análisis por IF muestra que en todos los cultivos Sox2 se situaba de forma difusa en el citoplasma y a modo de punteado perinuclear. En ASZ 10<sup>a</sup>G T y CSZ P T y 10<sup>a</sup>G T se observó además una expresión nuclear homogénea que, en el caso de CSZ 10<sup>a</sup>G T, fue más intensa en la subpoblación fibroblastoide (flecha) que en la poligonal (asterisco). (B) Como control positivo de Sox2 se usaron las células P19 (derivadas de un carcinoma embrionario murino), en las que la proteína se situaba principalmente a nivel nuclear y presentaban elevada expresión a nivel de ARNm (datos no mostrados). (C) La expresión a nivel de ARNm fue valorada mediante RT-PCR. Los resultados señalaron un aumento significativo de Sox2 en ASZ 10<sup>a</sup>G T y CSZ 10<sup>a</sup>G T respecto a sus P T. Además, en ASZ P T fue menor que en P. Sin embargo, en BSZ 10<sup>a</sup>G la expresión fue menor que en sus P. Se muestran los valores relativizados a P. (\*\*\*:  $P < 0,01$ ).



El análisis a nivel de ARNm mediante RT-PCR (**Fig. 32 C**) reveló que, en ASZ, la expresión se incrementaba en las 10<sup>a</sup>G respecto a P y significativamente en 10<sup>a</sup>G T respecto a sus P T; y fue menor en P T que en P. En BSZ, por el contrario, la expresión disminuía en las 10<sup>a</sup>G en comparación con sus P, y de forma no significativa en 10<sup>a</sup>G T respecto a P T. En cuanto a CSZ, se observó una tendencia al aumento de expresión en 10<sup>a</sup>G en comparación con P y, de forma significativa, también en 10<sup>a</sup>G T respecto a P T.

#### 4.1.2.9.4. Oct4

El factor de transcripción Oct4 presenta una expresión elevada en células con propiedades de CM. También se relaciona con la resistencia a terapias y con un mal pronóstico en pacientes (Villodre *et al.*, 2016).

Como muestra el análisis por IF (**Fig. 33 A**), en todas las líneas celulares la proteína se localizó de forma difusa en el citoplasma y a modo de punteado o red en la región perinuclear. Como control positivo de expresión se utilizaron las células P19 (**Fig. 33 B**), en las cuales Oct4 se localizó a nivel tanto citoplasmático como nuclear.

En la **Fig. 33 C** se muestra la expresión a nivel de ARNm, analizando la secuencia preamplificada de *Oct4* mediante RT-PCR. La expresión de *Oct4* parecía ser mayor en las 10<sup>a</sup>G que en las P y algo mayor en las 10<sup>a</sup>G T respecto a las P T.

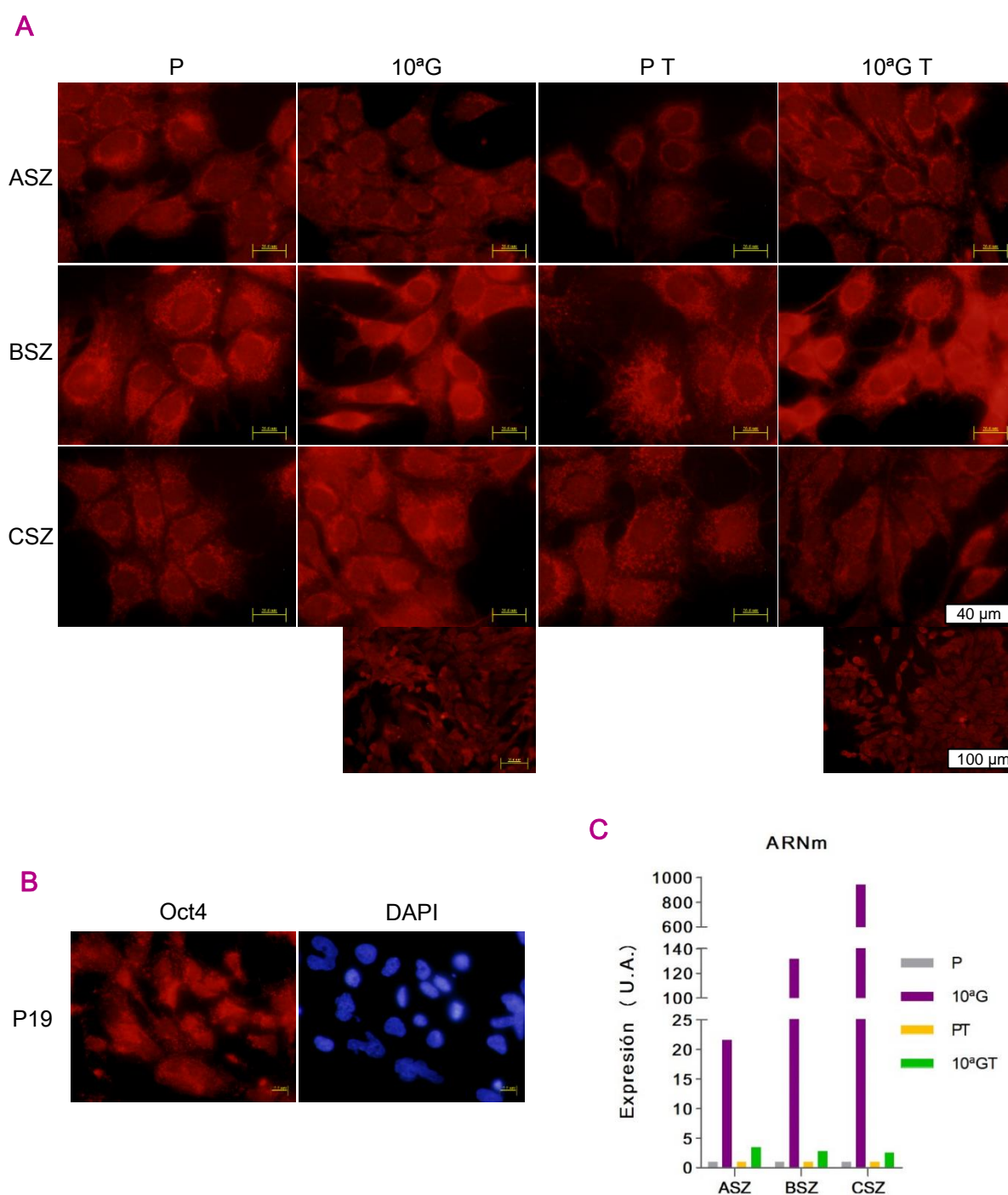
#### 4.1.2.9.5. Nanog

El factor de transcripción Nanog es un regulador clave del desarrollo embrionario y la reprogramación celular. Se ha descrito su elevada expresión en núcleo y/o citoplasma de numerosos tipos de cáncer, en los que juega un papel importante en la proliferación celular y en el proceso de malignización. Asimismo, su expresión se ha relacionado con resistencia a terapias y metástasis (Jeter *et al.*, 2015).

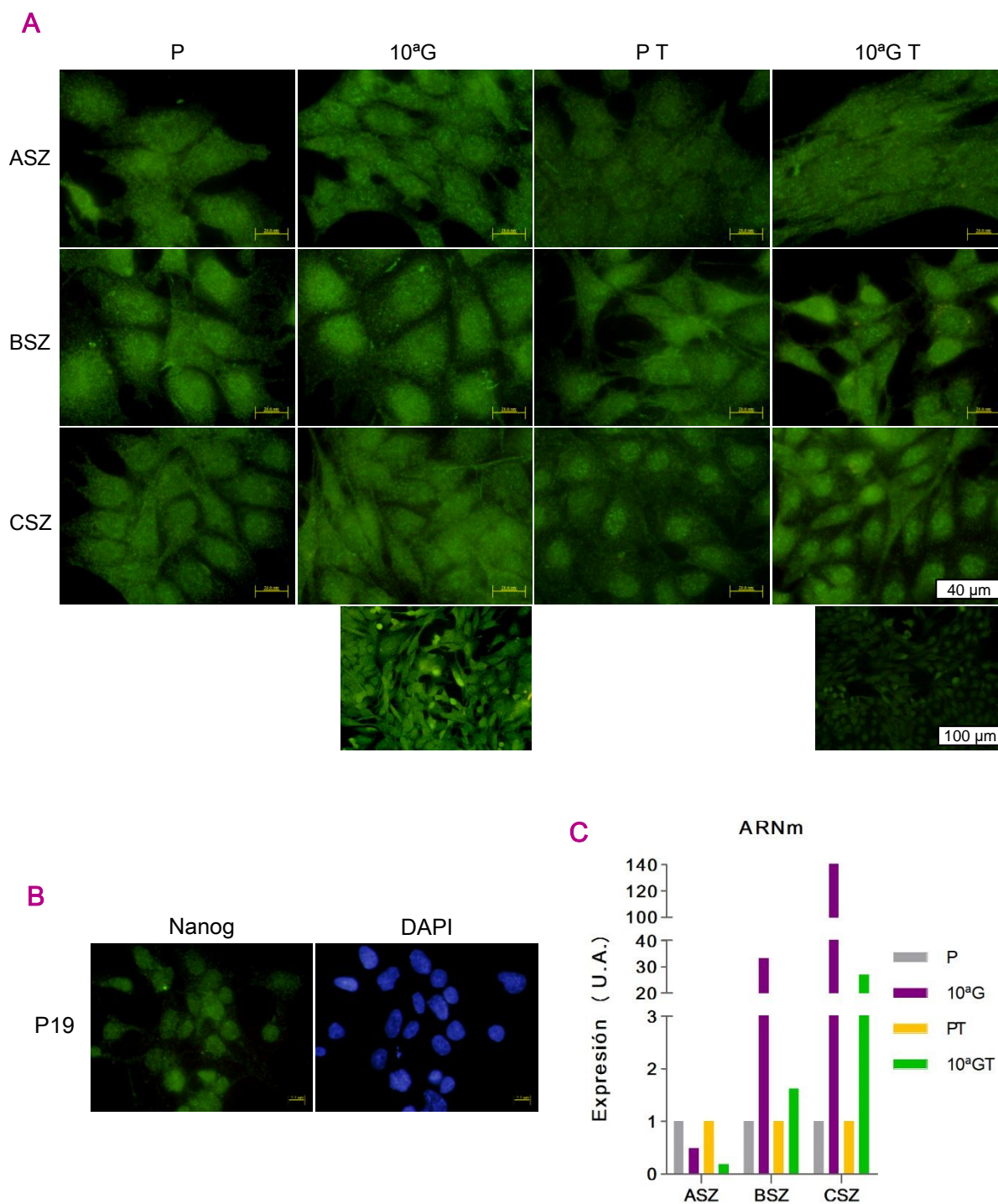
El análisis de la localización de Nanog mediante IF (**Fig. 34 A**) mostró que, en todas las poblaciones de ASZ, la proteína se distribuía de forma difusa por el citoplasma. En BSZ, aunque también se observó en el citoplasma, parecía concentrarse a nivel nuclear. En CSZ, P y 10<sup>a</sup>G también mostraron un patrón de Nanog difuso por el citoplasma, pero en P T y 10<sup>a</sup>G T se localizó de forma más clara en el núcleo. Se usaron como control positivo las células P19 (**Fig. 34 B**), en las cuales Nanog presentaba mayoritariamente una localización nuclear.

Los resultados obtenidos tras el análisis del ARNm, analizando la secuencia preamplificada de *Nanog* mediante RT-PCR (**Fig. 34 C**), mostraron que en ASZ la expresión tiende a disminuir en 10<sup>a</sup>G y 10<sup>a</sup>G T respecto a sus correspondientes P y P T, mientras que en BSZ y CSZ la expresión presentaba una tendencia a aumentar en 10<sup>a</sup>G y 10<sup>a</sup>G T respecto a P y P T, respectivamente.





**Fig. 33 Localización y expresión de Oct4.** (A) El estudio de la localización de esta proteína mediante IF mostró que la misma se situaba difusa y a modo de punteado perinuclear en todas las líneas celulares. (B) Las células P19 se utilizaron como control positivo de expresión del marcador. (C) Los datos obtenidos mediante RT-PCR, indicaron una tendencia de la expresión de Oct4 a aumentar en los cultivos de 10<sup>3</sup>G y 10<sup>3</sup>G T respecto a sus P y P T, respectivamente. Se representa la media de dos datos.



**Fig. 34 Localización y expresión de Nanog.** (A) La localización de este factor de transcripción se evaluó mediante IF, comprobándose que en todas las células mostraba una localización difusa en el citoplasma, con excepción de las células BSZ, dónde estaba más concentrada en el núcleo; y CSZ P T y 10<sup>3</sup>G T en las que se apreció localización nuclear. (B) Las células de carcinoma embrionario murino P19 se usaron como control positivo del marcador. (C) El análisis de expresión del ARNm por RT-PCR mostró una tendencia a disminuir en ASZ 10<sup>3</sup>G y 10<sup>3</sup>G T respecto a P y P T, mientras que en BSZ y CSZ sucedía lo contrario, las 10<sup>3</sup>G y 10<sup>3</sup>G T expresaban más *Nanog* que sus parentales. Se representa la media de dos datos.

## 4.2 Estudio de fibroblastos asociados a distintos tipos de CBC

En la segunda parte de este trabajo, se realizaron ensayos con fibroblastos humanos obtenidos mediante explante a partir de biopsias de pacientes con distintos tipos histológicos de CBC. Se cultivaron 12 muestras de pacientes correspondientes a tres variantes de CBC: superficial, nodular e invasivo. En el grupo invasivo se incluyeron muestras de CBC infiltrativo (SL10) y micronodular (SL11, SL12 y SL15). Se cultivaron además 4 muestras de piel sana como grupo control. La distribución y procedencia de los tumores se muestran en la **Tabla 7**.

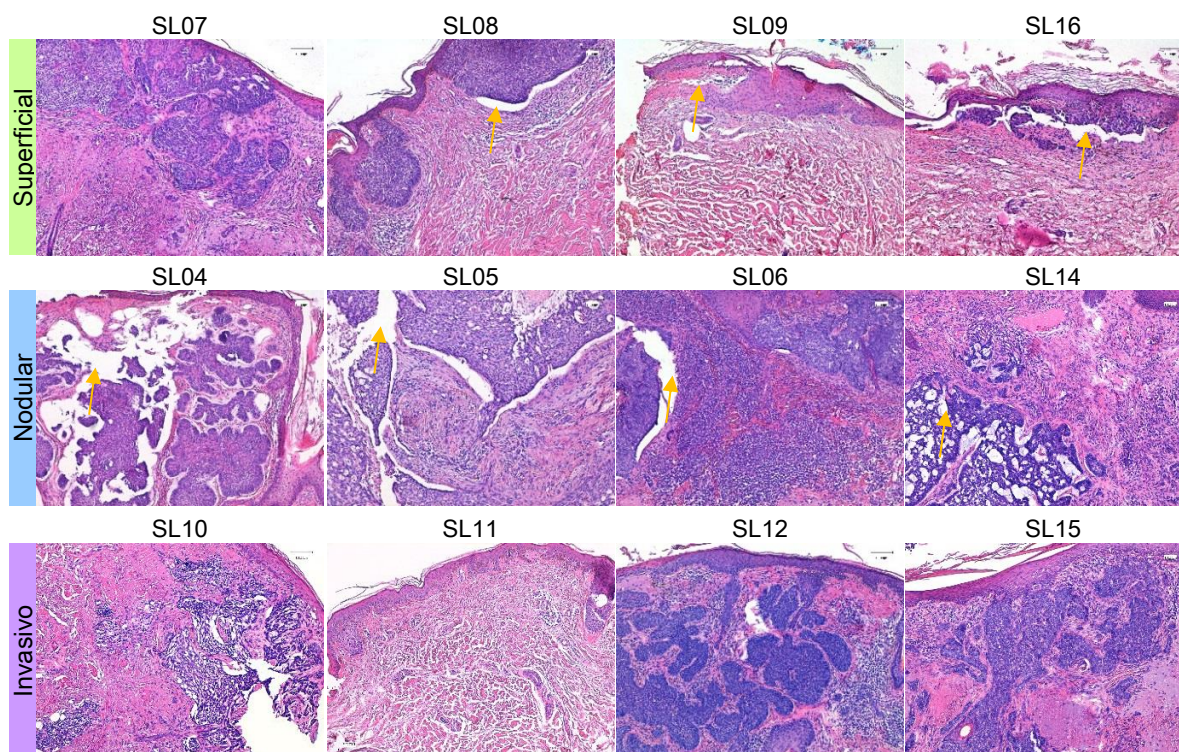
<i>Tipo de CBC</i>	<i>Muestra</i>	<i>Edad y sexo</i>	<i>Localización y tamaño del CBC</i>
<i>Control</i>	SL01	-	Dérmico
	SL02	Mujer, 19 años	Ingle
	SL03	Varón, niño	Prepucio
	SL13	Varón, niño	Prepucio
<i>Superficial</i>	SL07	Mujer, 89 años	Cuello, 2 x 2 cm
	SL08	Mujer, 72 años	Retroauricular, 2 x 1,2 cm
	SL09	Mujer, 72 años	Espalda, 2 x 2 cm
	SL16	Varón, 80 años	Pectoral (multicéntrico), 1 x 1 cm
<i>Nodular</i>	SL04	Varón, 82 años.	Nasal, 2 x 2 cm
	SL05	Mujer, 88 años	Retroauricular, 0,6 x 0,6 cm
	SL06	Varón, 86 años	Mejilla, 1,7 x 0,8 cm
	SL14	Varón, 85 años	Dorso nasal, 1,8 x 1,5 cm
<i>Invasivos</i>	SL10	Mujer, 87 años	Frente, 1 x 1 cm
	SL11	Varón, 82 años	Brazo, 2 x 1,2 x 0,5 cm
	SL12	Varón, 32 años	Ala nasal, 2 x 0,9 cm
	SL15	Varón, 82 años	Periauricular, 1,7 x 0,6 cm

**Tabla 7** Fibroblastos obtenidos a partir de cultivos de biopsias de CBC. En la tabla se muestran las características de los pacientes (sexo y edad) y de los CBCs biopsiados (localización y tamaño) a partir de los cuales se cultivaron los fibroblastos empleados en este estudio.

### 4.2.1. Análisis histológico e inmunohistoquímico de los CBCs

La valoración histológica (diagnóstico) de los tumores de los pacientes fue realizada por el patólogo Israel Bernal del Hospital Central de la Cruz Roja San José y Santa Adela (Madrid) tras la tinción con H/E (**Fig. 35**). Los diagnosticados como CBCs superficiales presentaban hiperproliferación local de los queratinocitos de la capa basal de la piel, siempre confinados a la epidermis y paralelos a la superficie. La disposición de las células en la periferia de los agregados tumorales era columnar y ordenadas recordando una empalizada. El estroma peritumoral es muy característico, con una retracción que es artefactual, delimitando los islotes tumorales. En los nodulares, se observaron mayores masas tumorales formando grandes nidos de células basales. Los tumores invasivos presentaban numerosos nódulos tumorales en la epidermis más angulosos que en los nodulares, y que infiltraban la dermis.





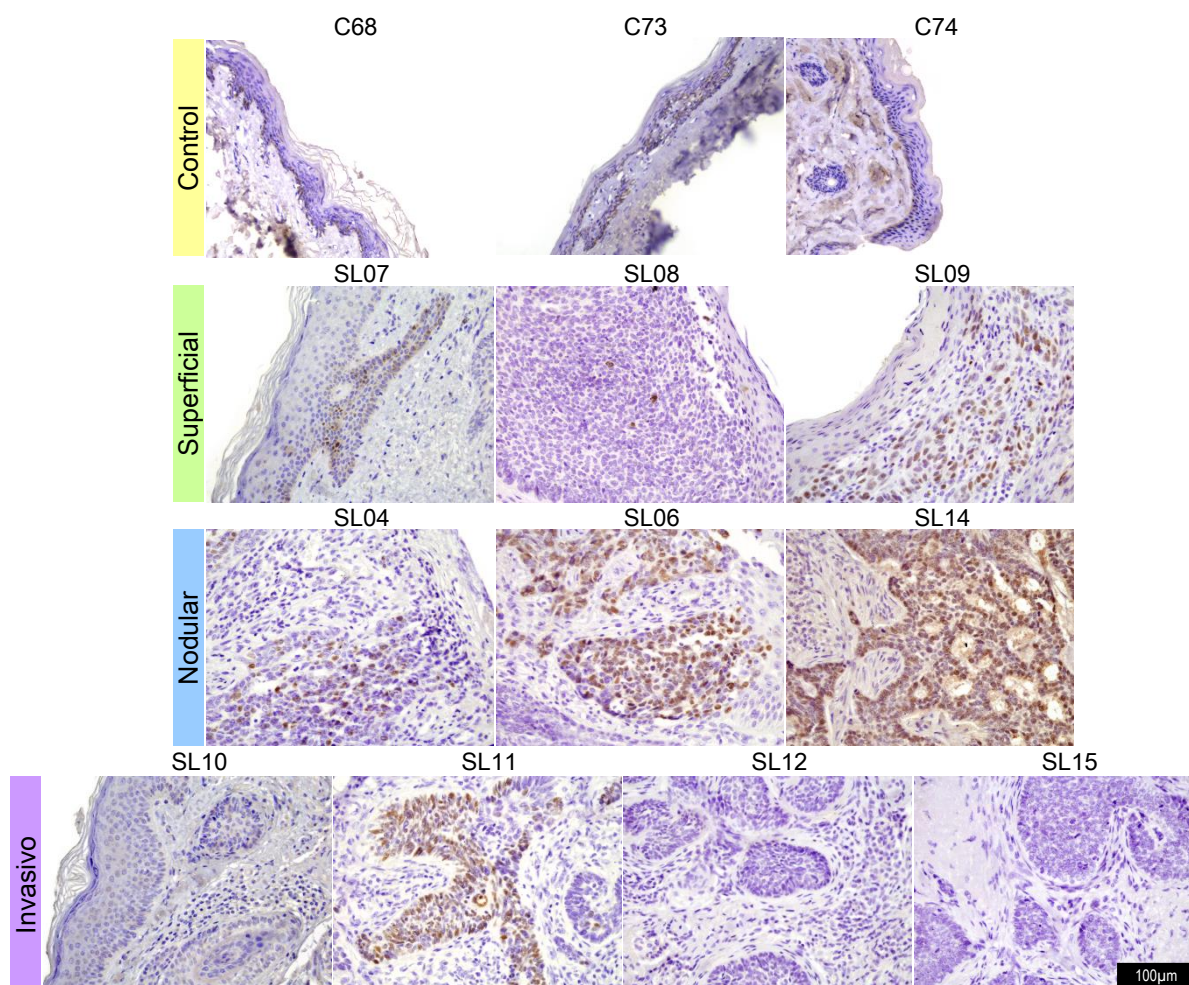
**Fig. 35** Histología de los tumores de pacientes de CBC tras la tinción con H/E. Se muestran las imágenes de las biopsias de distintos tipos de CBCs humanos tras su tinción con H/E. Se indica con una flecha la retracción artefactual.

#### 4.2.1.1. Expresión de marcadores relacionados con carcinogénesis

En las biopsias de los CBCs de pacientes, se valoró la expresión y localización de diferentes marcadores relacionados con el proceso tumoral. El estudio se realizó en 3 de los 4 superficiales y nodulares y en los 4 invasivos. Como controles de la técnica se emplearon muestras de piel sana de referencia del Hospital Central de la Cruz Roja. En el **Anexo 1** se muestra el resumen de las observaciones realizadas por IHQ de los distintos marcadores.

El gen supresor de tumores **P53** se activa en respuesta a distintos tipos de estrés y aparece alterado en la mayoría de cánceres. Su proteína actúa en diversos procesos clave como el control del ciclo celular, la reparación del ADN, la apoptosis o la inhibición de la angiogénesis y la metástasis (Benjamin *et al.*, 2008; Bieging *et al.*, 2014).

Las muestras de piel control mostraron cierta expresión de P53 en algunas células del estrato basal de la epidermis (**Fig. 36**). En cuanto a los superficiales, se observaron células marcadas en la lesión epidérmica, las cuales eran escasas en SL08. En los CBCs nodulares, P53 se expresaba en amplias zonas de la masa tumoral, sobre todo en SL14. Por último, en los CBCs invasivos, sólo se detectó marcaje en la masa tumoral de SL11.



**Fig. 36 Expresión de P53 en distintos tipos de CBC.** En las imágenes de IHQ, se observó que la expresión de P53 en la piel control se restringía a algunas células del estrato basal de la epidermis. En los CBCs superficiales se observaron células positivas en el interior de la masa tumoral (más escasas en SL08). En los nodulares y en el invasivo SL11 se observó marcaje en las células de la masa tumoral.

El receptor de membrana tirosina-quinasa **EGFR** está implicado en proliferación celular, supervivencia y diferenciación. Se encuentra desregulado en una gran variedad de carcinomas ([Seshacharyulu et al., 2012](#); [Yewale et al., 2013](#)).

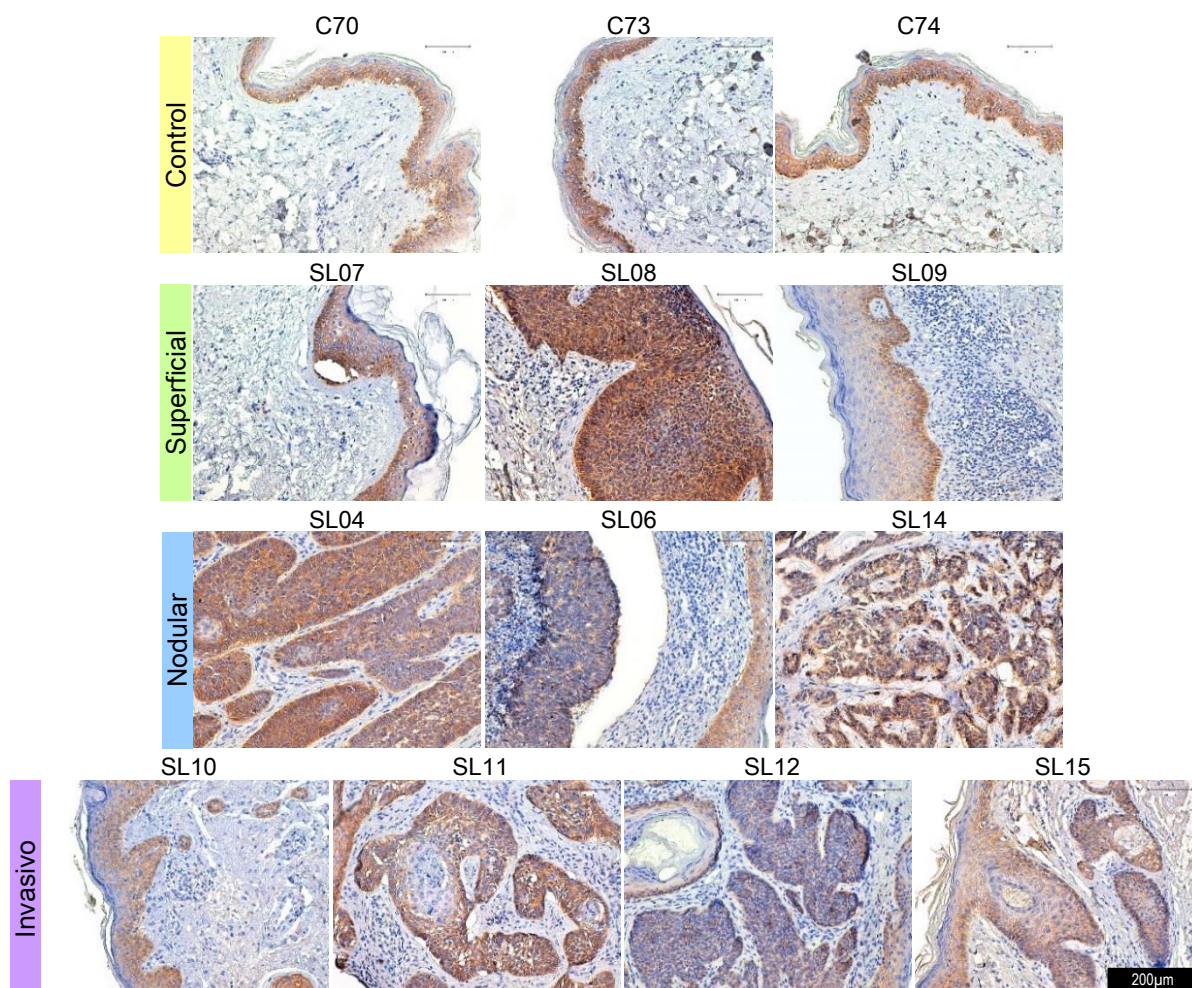
Como era de esperar, EGFR se expresaba en la epidermis de todas las muestras control, de forma más evidente en la zona basal de la misma (**Fig. 37**). Ese mismo patrón de expresión se observó en las masas tumorales de los CBCs superficiales. Los tumores nodulares expresaban EGFR en toda la extensión de la lesión, aunque en SL06 el marcaje era más difuso que en la epidermis peritumoral. Todos los tumores invasivos mostraron expresión de EGFR en los acúmulos de células tumorales.

Cómo se ha descrito anteriormente, **SOX2** es un marcador de CMCs ([Liu et al., 2013](#)).

En las muestras de piel sana sólo se observó marcaje en la capa basal de la epidermis (**Fig. 38**). En los CBCs superficiales se apreció marcaje en el estrato basal de



la epidermis patológica de SL07 y SL09 y en algunas células aisladas de SL08. En cuanto a las muestras nodulares, sólo SL04 mostró marcaje, apareciendo en la periferia de cada lóbulo de la masa tumoral. Finalmente, en los CBCs invasivos, sólo se detectó expresión de SOX2 en la capa basal de la epidermis patológica del SL11.

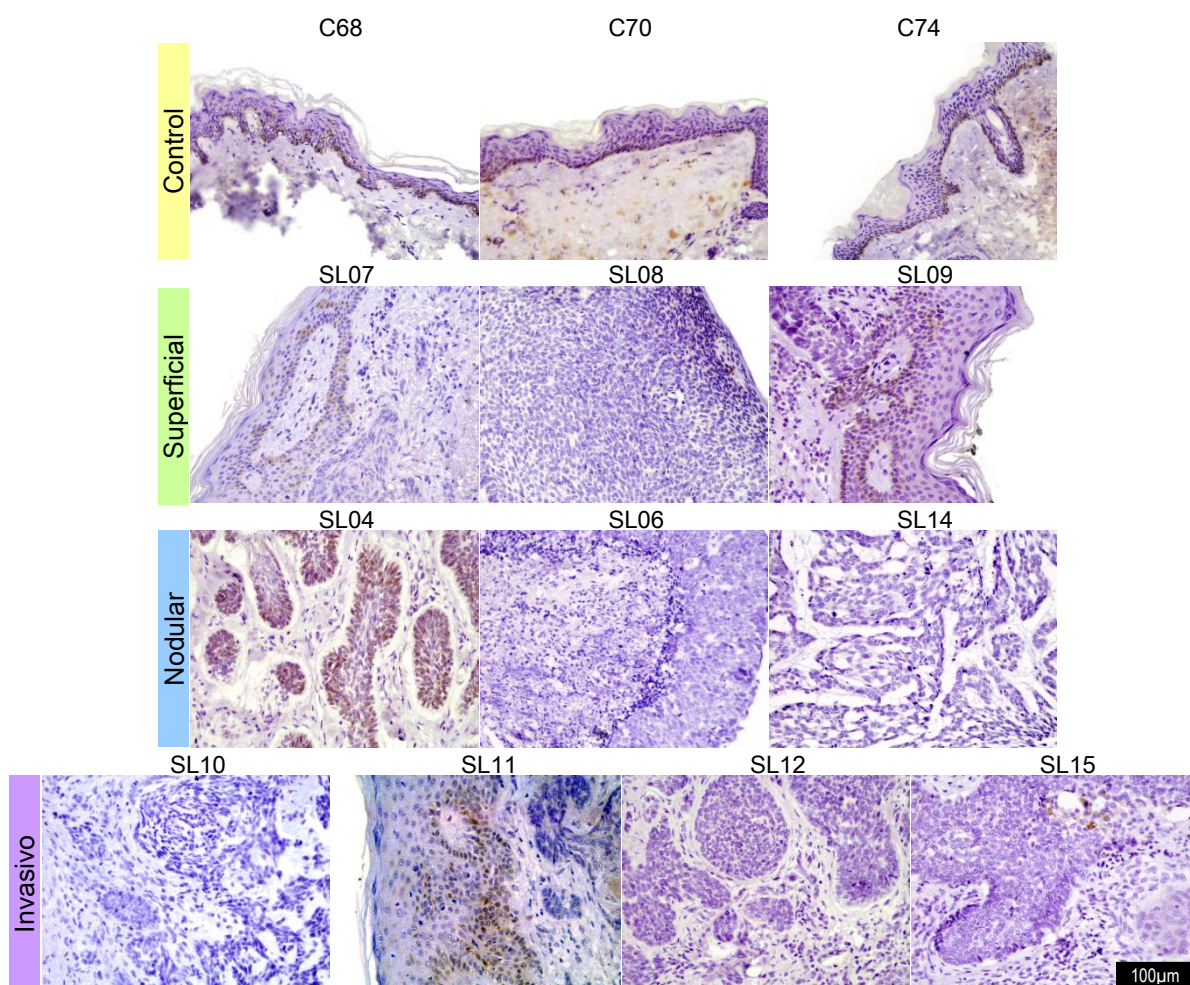


**Fig. 37** Expresión de EGFR en distintos tipos CBC. El análisis por IHQ indicó que, en la piel sana, EGFR se expresaba en la epidermis, especialmente en la capa basal. Esta misma distribución se observó en los CBCs superficiales. En los CBCs nodulares e invasivos la expresión de este marcador abarcaba toda la lesión.

La **PDPN** se expresa en el endotelio linfático, en el frente tumoral y se ha visualizado en células del estroma tumoral, como los CAFs, lo que correlaciona con la progresión del cáncer (Raica *et al.*, 2008; Kan *et al.*, 2014).

En las muestras control, la expresión de PDPN se localizó en los vasos linfáticos y en la capa basal de la epidermis (**Fig. 39**). En el caso de los CBCs superficiales, SL07 y SL09 mostraron marcaje en el estrato basal de la epidermis, más intenso que el observado en los controles y en los vasos linfáticos; mientras que en SL08 sólo se apreció en el endotelio de los vasos linfáticos. Los CBCs nodulares SL04 y SL06 mostraron expresión en ciertas zonas de la capa basal de la epidermis, mientras que en SL14 se localizó

intensa pero difusa en toda la masa tumoral. En los CBCs invasivos, se detectó señal en SL11, SL12 y SL15 en los vasos linfáticos.



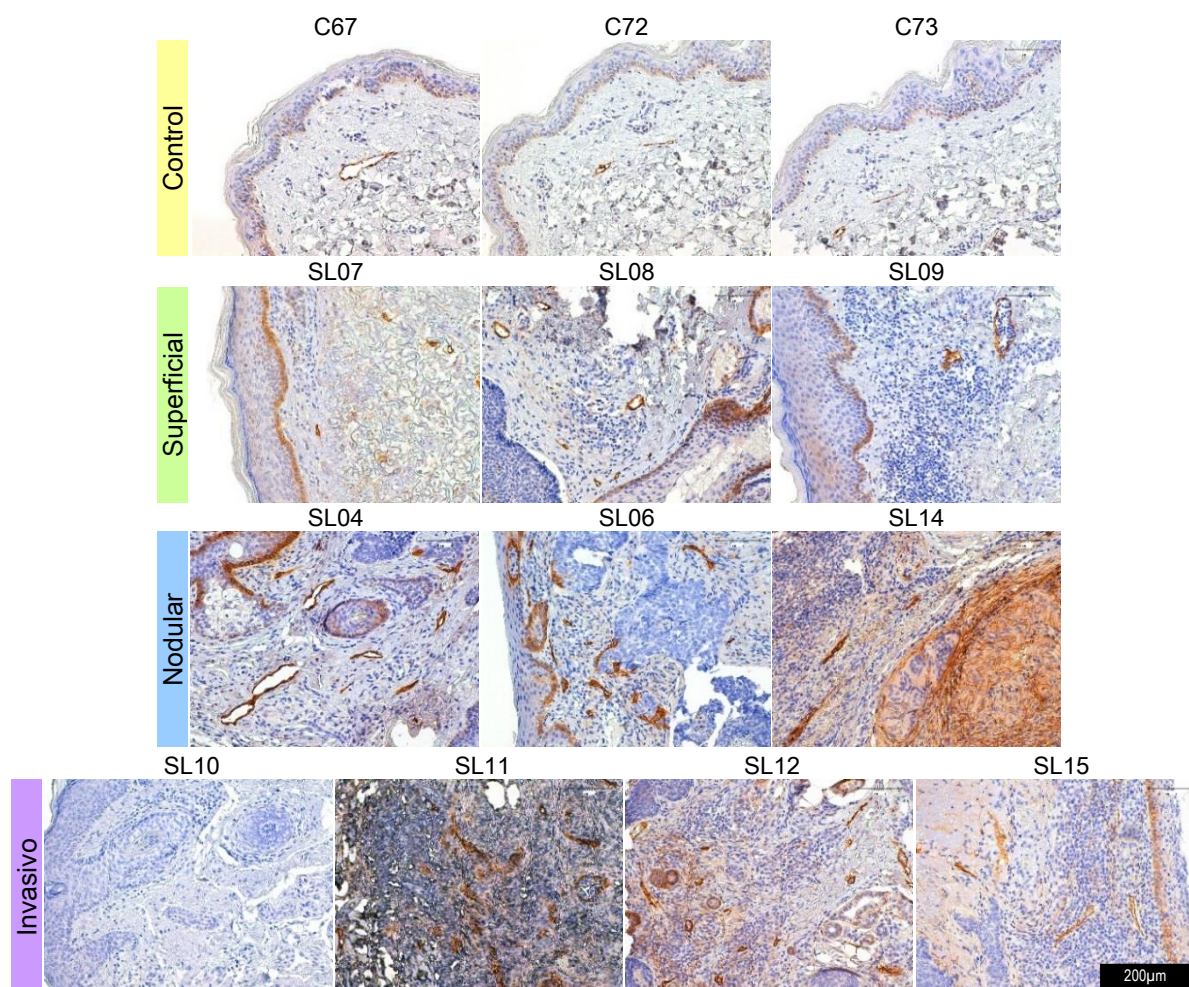
**Fig. 38 Expresión de SOX2 en distintos tipos de CBC.** Como muestran las imágenes de IHQ, la expresión de SOX2 en la piel control estaba confinada a la capa basal de la epidermis. En los CBCs superficiales, SL07 y SL09 también mostraron marcaje en el estrato basal epidérmico y en SL08 solamente se vieron algunas células positivas aisladas. En los nodulares, SL04 presentó marcaje en la periferia de cada lóbulo de la masa tumoral, mientras que en SL06 y SL14 no se observó expresión. De los CBCs invasivos sólo se vio expresión en la capa basal de la epidermis patológica de SL11.

La proteína  **$\alpha$ -SMA** es un marcador de miofibroblastos, los cuales facilitan la progresión tumoral, siendo también considerado un marcador de CAFs (Choi *et al.*, 2013; Kalluri, 2016).

En el tejido control, en general, se observó expresión de  $\alpha$ -SMA en la zona basal de la epidermis y en el entorno de los vasos sanguíneos (Fig. 40). En los CBCs superficiales se observaron distintos patrones: SL07 presentaba algún parche positivo de pequeño tamaño en la dermis, SL08 expresaba la proteína en la zona interna de la masa tumoral y, en SL09, parecía expresarse sólo en las células endoteliales. Las muestras de nodulares presentaron expresión uniforme de la proteína en el estroma y SL04 y SL14



también presentaron marcaje en la masa tumoral. Asimismo, en los CBCs invasivos SL10, SL11 y SL15 se observó marcaje con distintas intensidades en la masa tumoral y el estroma, mientras que en SL12 sólo se apreció en el tumor.

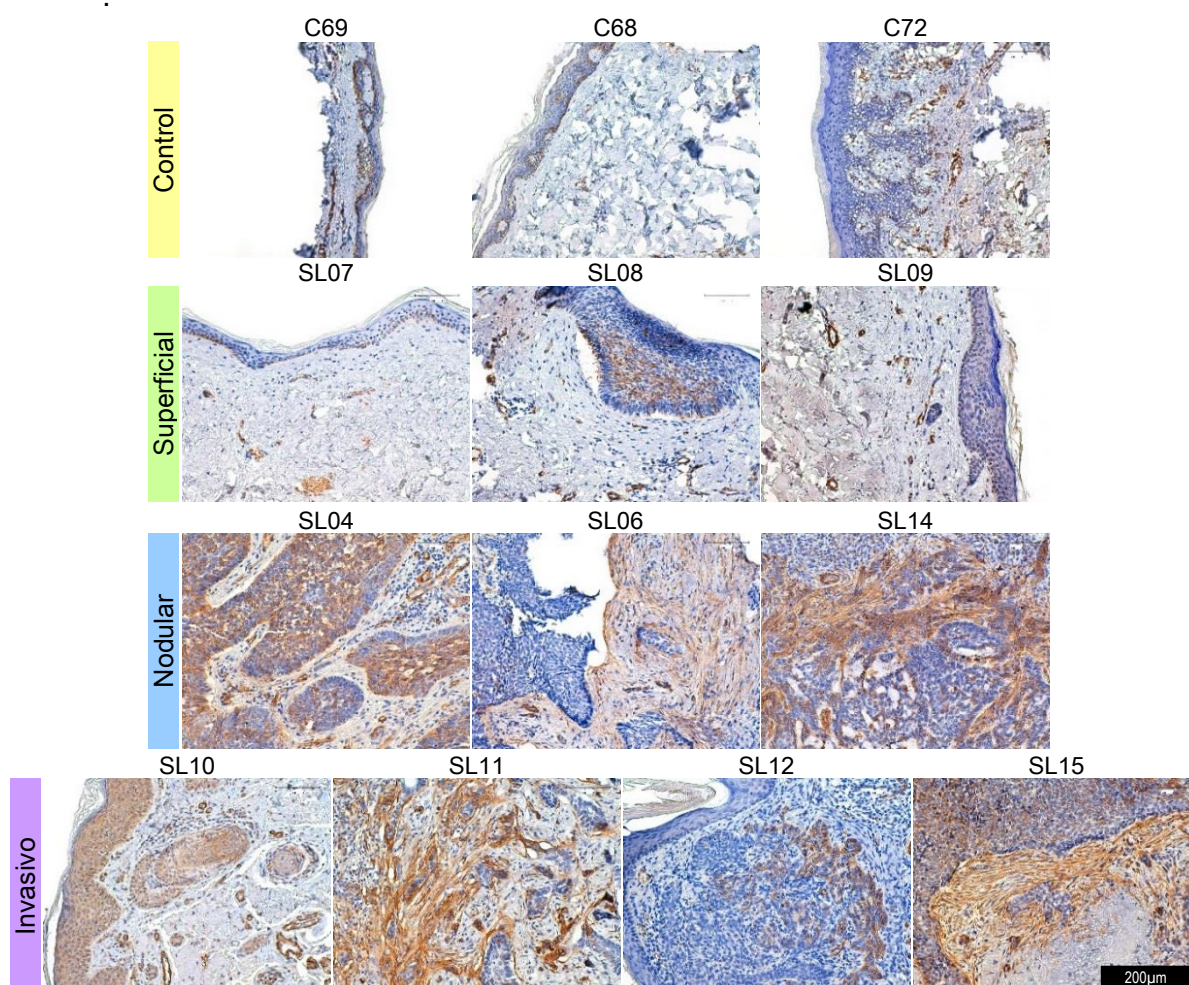


**Fig. 39 Expresión de Podoplanina en distintos tipos de CBC.** Las IHQs confirmaron que, en la piel sana, PDPN se expresaba en los vasos linfáticos y en la capa basal de la epidermis. En los CBCs superficiales se observó marcaje en los vasos linfáticos y, además, SL07 y SL09 mostraron expresión en el estrato basal de la epidermis. Los CBCs nodulares SL04 y SL06 mostraron expresión en ciertas zonas de la capa basal de la epidermis, mientras que en SL14 se observó un patrón difuso en la masa tumoral. En los invasivos, la proteína se expresó en los vasos linfáticos, salvo en el caso de SL10, que no mostró marcaje.

#### 4.2.2. Caracterización de los fibroblastos procedentes de los CBCs

La morfología celular de los distintos fibroblastos fue evaluada tras la tinción con azul de toluidina y su posterior análisis por microscopía óptica (**Fig. 41**). Los fibroblastos, con independencia de su procedencia (piel sana o CBC), presentaron una morfología similar con forma alargada, núcleo con cromatina laxa y varios nucléolos.





**Fig. 40 Expresión de  $\alpha$ -SMA en distintos tipos de CBC.** Los resultados obtenidos por IHQ indicaron que, en el tejido control, esta proteína se expresaba en la zona basal de la epidermis y en el entorno de los vasos sanguíneos. Los CBCs superficiales mostraron distinta distribución de  $\alpha$ -SMA: en SL07 se vieron parches de pequeño tamaño en la dermis, en SL08 se expresaba en la zona interna del tumor y en SL09 sólo se observó en las células endoteliales de los vasos. En los nodulares, apareció marcaje en el estroma tumoral y, en SL04 y SL14 además, se expresó en la masa tumoral. En los CBCs invasivos SL10, SL11 y SL15, se expresó con distintas intensidad a nivel de tumor y del estroma, mientras que en SL12 sólo se expresó a nivel del tumor.

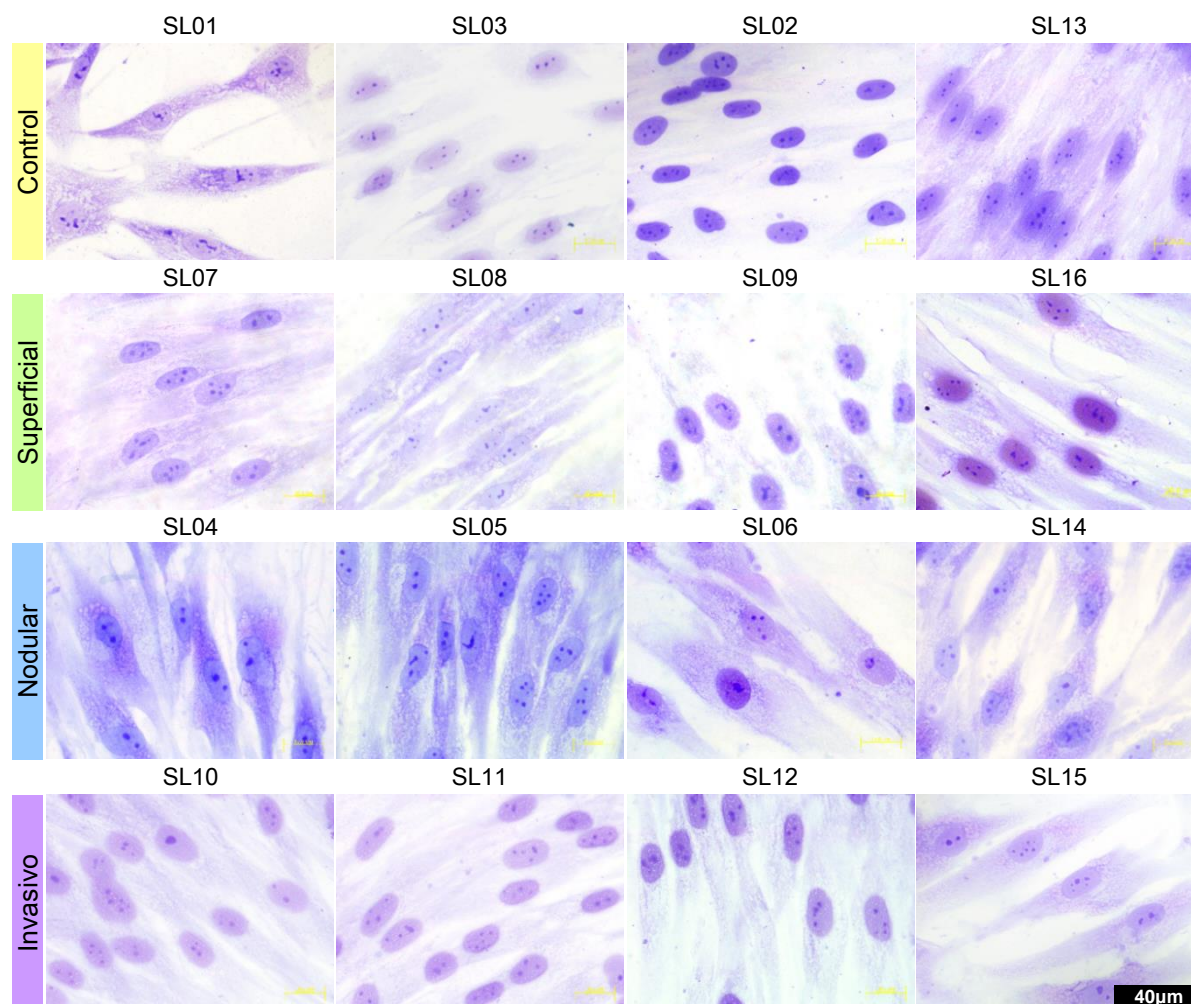
#### 4.2.2.1. Valoración de la expresión de marcadores de CAFs

Dado su origen, se procedió a determinar si los fibroblastos aislados presentaban características típicas de CAFs, analizando para ello la expresión de marcadores específicos y comprobando si se diferenciaba de la observada en los fibroblastos procedentes de tejido sano (control). En la **Tabla 8** se resumen los resultados obtenidos en la evaluación de IF.

##### 4.2.2.1.1. Vinculina

La Vinculina es una proteína que se localiza en los contactos focales y en las uniones célula-sustrato, y está unida a la F-actina. Posee múltiples funciones: proporciona

un anclaje mecánico, controla procesos de señalización celular y se ha sugerido que actúa como supresor tumoral, ya que favorece el crecimiento celular dependiente de anclaje, reduciendo la motilidad y por ende, impidiendo la metástasis (Goldmann *et al.*, 2013; Goldmann, 2016). En miofibroblastos esta proteína se encuentra sobreexpresada (Gonda *et al.*, 2010).



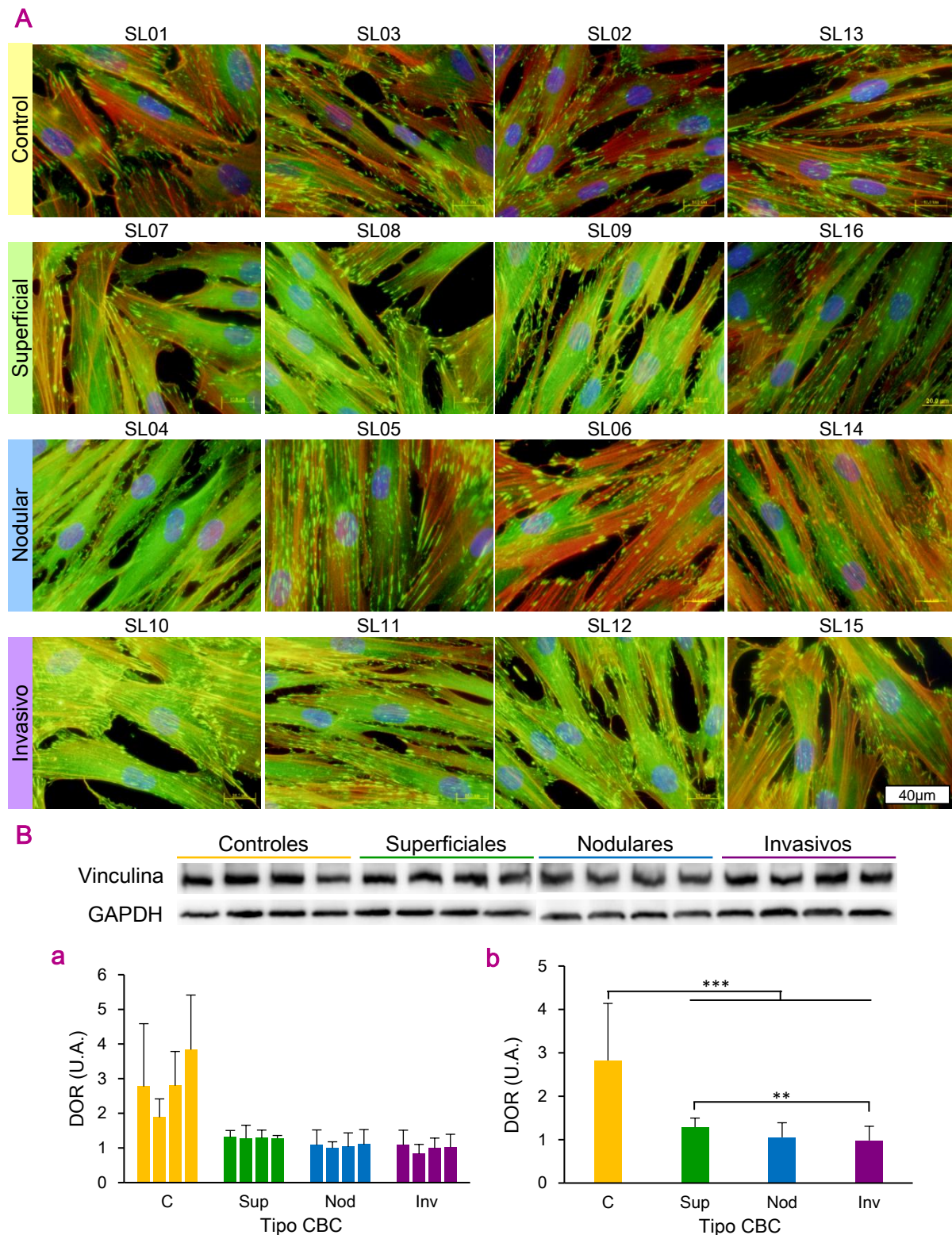
**Fig. 41** Morfología de los fibroblastos obtenidos a partir de biopsias humanas control y de CBCs. La morfología de los fibroblastos fue analizada mediante microscopía óptica, tras su tinción con azul de toluidina. Todos los cultivos mostraron células alargadas con la presencia de varios nucleólos en sus núcleos.

Las imágenes correspondientes a la IF (**Fig. 42 A**) muestran que en los fibroblastos control esta proteína se encontraba localizada en los numerosos contactos focales, donde las fibras de estrés (microfilamentos de actina) se anclan a la membrana y al sustrato. En los fibroblastos procedentes de los CBCs superficiales, además, se apreciaba una señal difusa en el citoplasma. En los nodulares se observaron distintas localizaciones: en SL04 apareció dispersa en el citoplasma y con una señal débil en los contactos focales; en SL05, SL06 y SL14 se observó marcaje difuso en el citoplasma y positivo en los contactos focales. En los fibroblastos de CBCs invasivos, la Vinculina mostró una localización muy

Grupo	Muestra	Marcadores de CAFs							
		Vinculina	Vimentina	FAP-1	Endoglina	α-SMA	S100A4	GAL-1	MMP-9
Control	SL01	Contactos focales	Fibras citoplasmáticas poco definidas	Núcleo y citoplasma	Citoplasma y membrana	Citoplasma	Red tipo RE	Citoplasma	Citoplasma
	SL03		Fibras citoplasmáticas			Citoplasma y fibras			
	SL02								
	SL13								
Superficial	SL07	Contactos focales y citoplasma	Fibras citoplasmáticas poco definidas	Núcleo y citoplasma	Citoplasma y membrana (más intenso en algunas células)	Citoplasma y fibras	Red tipo RE	Citoplasma	Citoplasma
	SL08		Fibras citoplasmáticas		Citoplasma, membrana (más intenso en algunas células) y punteado	Citoplasma			
	SL09		Fibras citoplasmáticas poco definidas						
	SL16		Fibras citoplasmáticas					Punteado citoplasmático	
Nodular	SL04	Contactos focales (débil) y citoplasma	Fibras citoplasmáticas	Núcleo y citoplasma	Citoplasma y membrana (más intenso en algunas células)	Citoplasma	Red tipo RE y fibras periféricas	Citoplasma	Citoplasma
	SL05	Contactos focales y citoplasma			Citoplasma y membrana	Citoplasma y fibras	Red tipo RE y citoplasma	Citoplasma y núcleo	
	SL06				Citoplasma y membrana (poco intenso)		Red tipo RE	Citoplasma	
	SL14				Citoplasma y membrana	Citoplasma	Red tipo RE y citoplasma		
Invasivo	SL10	Contactos focales y citoplasma	Fibras citoplasmáticas poco definidas	Núcleo y citoplasma	Citoplasma y membrana (más intenso en algunas células)	Citoplasma y fibras	Red tipo RE, citoplasma y fibras periféricas	Citoplasma	Citoplasma
	SL11					Citoplasma	Red tipo RE		
	SL12				Citoplasma, membrana (más intenso en algunas células) y punteado	Citoplasma y fibras	Red tipo RE, citoplasma y fibras periféricas	Citoplasma y gránulos perinucleares	
	SL15								

**Tabla 8** Patrón de expresión y localización de marcadores de CAFs en fibroblastos aislados a partir de biopsias de distintos tipos de CBC. Se indica tanto la localización como la distribución intracelular de cada uno de los marcadores, analizadas mediante IF.





**Fig. 42 Localización y expresión de Vinculina en fibroblastos de CBC.** (A) En el análisis por IF, los fibroblastos control mostraron la Vinculina (señal de fluorescencia verde) en los contactos focales. En los fibroblastos de CBCs superficiales, además, se observó difusa en el citoplasma. En los fibroblastos del CBC nodular SL04 se apreció dispersa en el citoplasma y débilmente en los contactos focales; y en SL05, SL06 y SL14 la señal estaba difusa en el citoplasma e intensa en los contactos focales. Igualmente, en los fibroblastos de CBC invasivo la Vinculina se observó dispersa en el citoplasma y en los contactos focales. La señal roja corresponde a la F-actina. (B) Se muestra un experimento representativo de WB. (B.a) La cuantificación de la proteína mostró expresión variable de proteína entre las muestras control y más homogénea entre las muestras de los distintos tipos de CBCs. (B.b) El grupo control mostró mayor expresión de proteína que el resto de grupos, y los fibroblastos de CBCs superficiales mayor que de los invasivos. (\*\*:  $P < 0,05$ ; \*\*\*:  $P < 0,01$ ).

dispersa en el citoplasma y también se visualizó en numerosos contactos focales en la periferia celular. La cuantificación de la expresión de esta proteína mediante WB (**Fig. 42 B**), indicó la existencia de variabilidad entre las muestras control, mientras que en los fibroblastos de CBC la expresión fue muy similar dentro de cada grupo (**Fig. 42 Ba**). La comparación entre grupos (**Fig. 42 Bb**) reveló que la expresión de Vinculina en el grupo control era significativamente más elevada que la de los tres grupos de fibroblastos procedentes de CBC ( $P<0,01$ ). Además, la expresión también era mayor en los superficiales que en los invasivos ( $P<0,05$ ).

#### 4.2.2.1.2. Vimentina

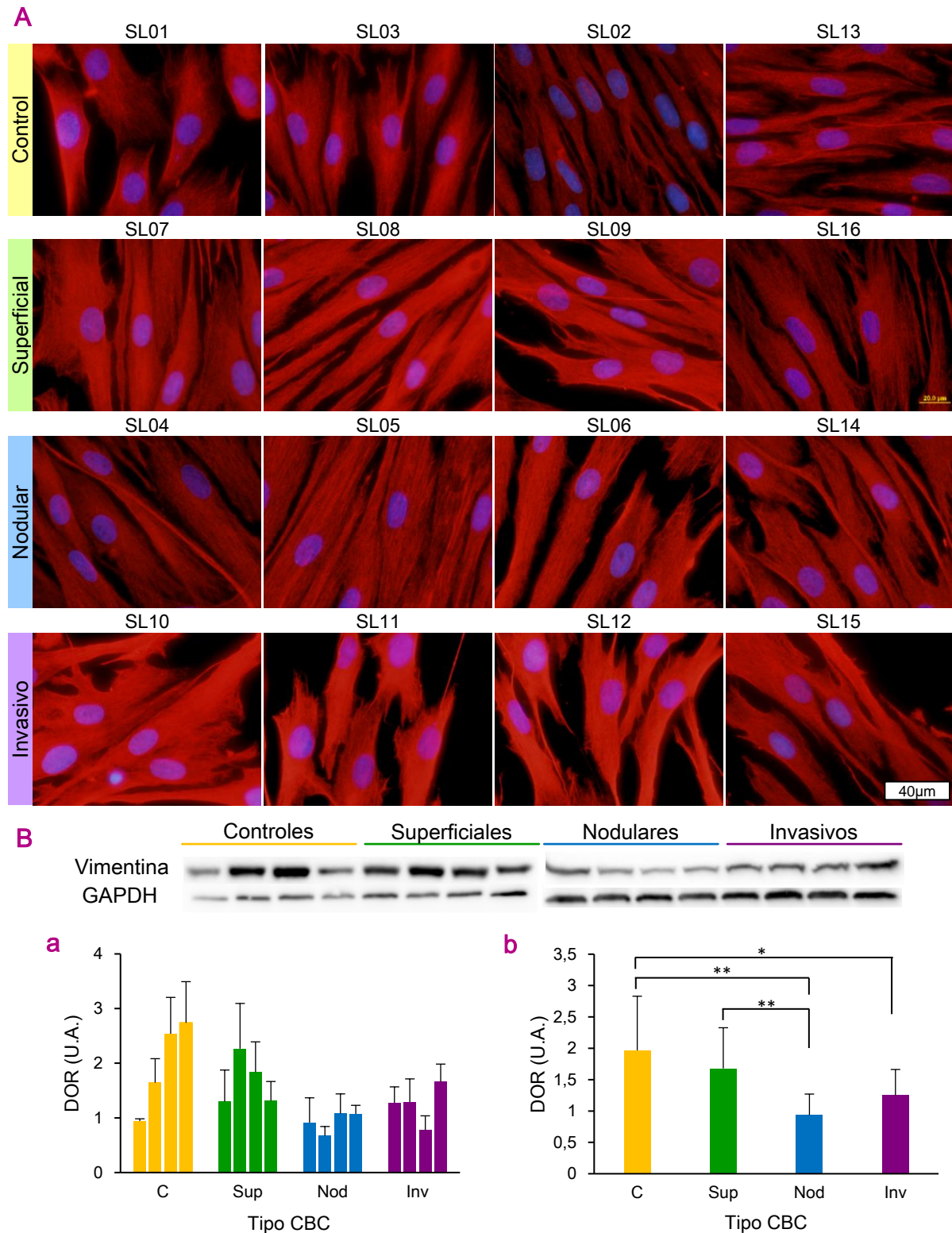
La Vimentina, como se ha mencionado anteriormente, es una proteína relacionada con la progresión tumoral y su sobreexpresión se asocia a un fenotipo invasivo ([Satelli y Li, 2011](#)).

La expresión mediante IF se muestra en la **Fig. 43 A**. Los fibroblastos control SL01 y SL03 mostraron una señal poco definida de la proteína, mientras que en SL02 y SL13 formaba fibras estructuradas y paralelas al eje mayor de la célula. En los fibroblastos de CBCs superficiales también se visualizaron fibras, más definidas en SL08 y SL16 que en SL07 y SL09. Todos los fibroblastos de CBC nodular presentaban una distribución similar de la proteína, formando fibras citoplasmáticas paralelas al eje principal de la célula. Por último, en los invasivos, Vimentina mostró un patrón de expresión más difuminado.

La evaluación, a nivel de proteína, mediante WB (**Fig. 43 Ba**), reveló una expresión variable de Vimentina entre las distintas muestras control, siendo menor en SL01 que en el resto. En los fibroblastos de CBC, la expresión de las muestras de un mismo grupo era más homogénea entre ellas. Según el análisis comparativo entre los distintos grupos (**Fig. 43 Bb**), los fibroblastos de CBC nodular e invasivo presentaban menor expresión de Vimentina que los control ( $P<0,01$  y  $P<0,05$ , respectivamente). Asimismo, la expresión en los nodulares fue menor que en los superficiales ( $P<0,01$ ). No se encontraron diferencias significativas entre controles y superficiales.

#### 4.2.2.1.3. FAP-1

La proteína transmembrana FAP-1 está implicada en degradación y remodelación de la MEC. Es producida de forma transitoria por los fibroblastos activados durante la embriogénesis y el cierre de herida. Se considera marcador de CAFs, ya que aparece sobreexpresada en la membrana de los fibroblastos en los tumores epiteliales ([Teichgräber et al., 2015](#)).



**Fig. 43 Localización y expresión de Vimentina en fibroblastos de CBC.** (A) Las imágenes de IF mostraron que los fibroblastos control SL01 y SL03 presentaron una señal poco definida, mientras que en SL02 y SL13 la proteína formaba fibras paralelas al eje mayor de la célula. En los fibroblastos de CBCs superficiales, esta proteína también se disponía en fibras, más definidas en el caso de SL08 y SL16. En todos los nodulares la proteína formaba fibras paralelas al eje principal del fibroblasto, mientras que en los invasivos la localización era dispersa y poco definida. (B) Se muestra un experimento representativo de WB. (B.a) La expresión intragrupo de la proteína era variable, sobre todo entre las muestras control. (B.b) La cantidad media de proteína no varió entre fibroblastos superficiales y control, mientras que en los fibroblastos nodulares e invasivos sí fue significativamente inferior con respecto a los control. Además, fue también significativamente menor en los fibroblastos nodulares respecto a los superficiales. (\*\*:  $P < 0,05$ ; \*\*\*:  $P < 0,01$ ).



Como muestra la IF (**Fig. 44 A**), en general, en todos los tipos de fibroblastos FAP-1 se localizaba difuso en el citoplasma y de forma más intensa en el núcleo. Los resultados de cuantificación por WB (**Fig. 44 Ba**), indicaron una expresión heterogénea entre las muestras control, siendo menor en la muestra SL02. Sin embargo, la expresión entre fibroblastos de un mismo tipo de CBC era similar. Además, todos los fibroblastos aislados de CBCs, tanto de superficiales, como de nodulares e invasivos, presentaban significativamente menor expresión de FAP-1 que los controles (**Fig. 44 Bb**). Concretamente, fueron los fibroblastos de CBCs nodulares los que presentaron la menor expresión, siendo menor a la de los invasivos ( $P<0,01$ ).

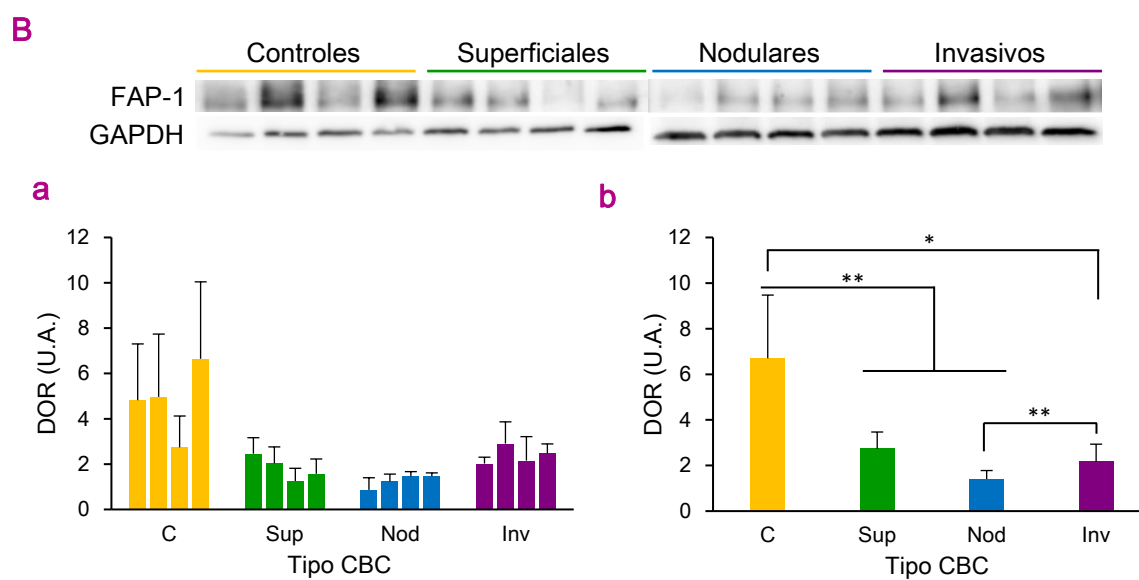
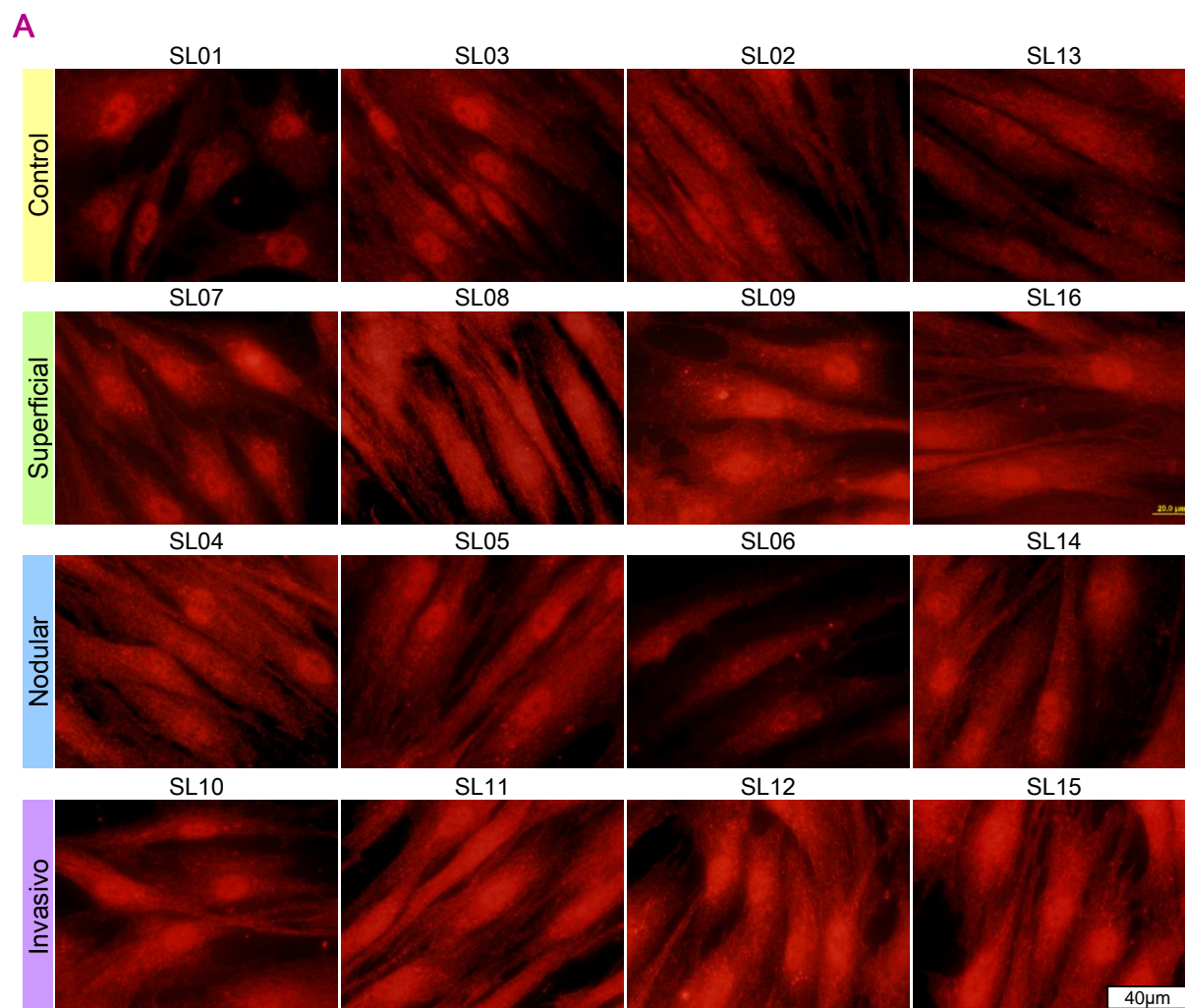
La cuantificación de la expresión de FAP-1 a nivel de ARNm, determinada mediante RT-PCR (**Fig. 44 C**), no reveló diferencias significativas entre los distintos tipos de CBC (datos no mostrados), aunque los superficiales SL08 y SL16 y el nodular SL05 presentaron una mayor expresión de FAP-1 que los fibroblastos control.

#### 4.2.2.1.4. Endogлина

La Endogлина o CD-105 (*Cluster of Differentiation 105*) es un receptor de membrana que interacciona con receptores tipo I y II de TGF- $\beta$  y modula su señal. Su expresión es regulada de forma positiva por el propio TGF- $\beta$  y ciertas situaciones de estrés como la hipoxia. Esta proteína se encuentra sobreexpresada en células endoteliales en proliferación, localizadas en tejidos con angiogénesis activa, como los tumores (Kopczyńska *et al.*, 2012).

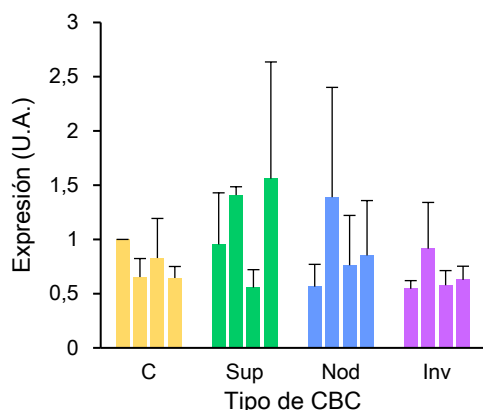
Por tanto, actúa regulando la angiogénesis. Además, se ha descrito su papel como supresor de la malignidad tumoral, aunque también puede favorecer la metástasis según el tipo de cáncer (Pérez-Gómez *et al.*, 2007 y 2010; Quintanilla *et al.*, 2015).

En el análisis por IF (**Fig. 45 A**) se observó que, en todos los fibroblastos control, la proteína se expresaba de forma uniforme en el citoplasma y en la membrana. Sin embargo, en los fibroblastos de CBC superficial, Endogлина mostró una señal más irregular, en algunas células, similar a los controles, pero en otras la expresión era más tenue. Además, se observó un punteado citoplasmático en algunos fibroblastos de los CBCs superficiales SL08, SL09 y SL16, que podría corresponder a vesículas del retículo endoplasmático (RE). En los nodulares se encontraron distintos patrones de expresión: distribución homogénea e intensidad baja (SL06), distribución homogénea e intensidad media (SL05 y SL14), y distribución heterogénea (SL04), similar a la de los superficiales. Los fibroblastos invasivos mostraron el mismo patrón de expresión que los superficiales.



**Fig. 44 (Parte 1)** Localización y expresión de FAP-1 en los fibroblastos de CBC.

C



**Fig. 44 (Continuación) Localización y expresión de FAP-1 en los fibroblastos de CBC.** (A) Las imágenes de IF mostraron que, en todos los grupos, FAP-1 se expresaba tanto en el núcleo como en el citoplasma, visualizándose más intensamente a nivel nuclear en todos los casos. (B) Se muestra un experimento representativo de WB. (B.a) La expresión intragrupo de FAP-1 fue heterogénea en el grupo control, mientras que en el resto de grupos era más homogénea (B.b) La expresión de FAP-1 era significativamente mayor en el grupo control que en el resto de grupos. Además, fue significativamente inferior en nodulares que en invasivos. (C) Se representan los valores de expresión a nivel de ARNm obtenidos mediante RT-PCR y relativizados a la muestra control SL01. No se observaron diferencias significativas entre los grupos (datos no mostrados). (\*\*:  $P<0,05$ ; \*\*\*:  $P<0,01$ ).

La cuantificación mediante WB (**Fig. 45 Ba**), reveló una expresión homogénea en las muestras de un mismo grupo de fibroblastos, a excepción de los fibroblastos nodulares, cuyas muestras SL05 y SL06 mostraron una menor expresión respecto al resto. En general, en los fibroblastos control se observó una mayor expresión de la proteína que en los fibroblastos de CBC ( $P<0,01$ ). Por último, la menor expresión de Endoglin, dentro de los fibroblastos procedentes de CBC, se registró en los nodulares, siendo significativamente menor que en los superficiales ( $P<0,01$ ) (**Fig. 45 Bb**).

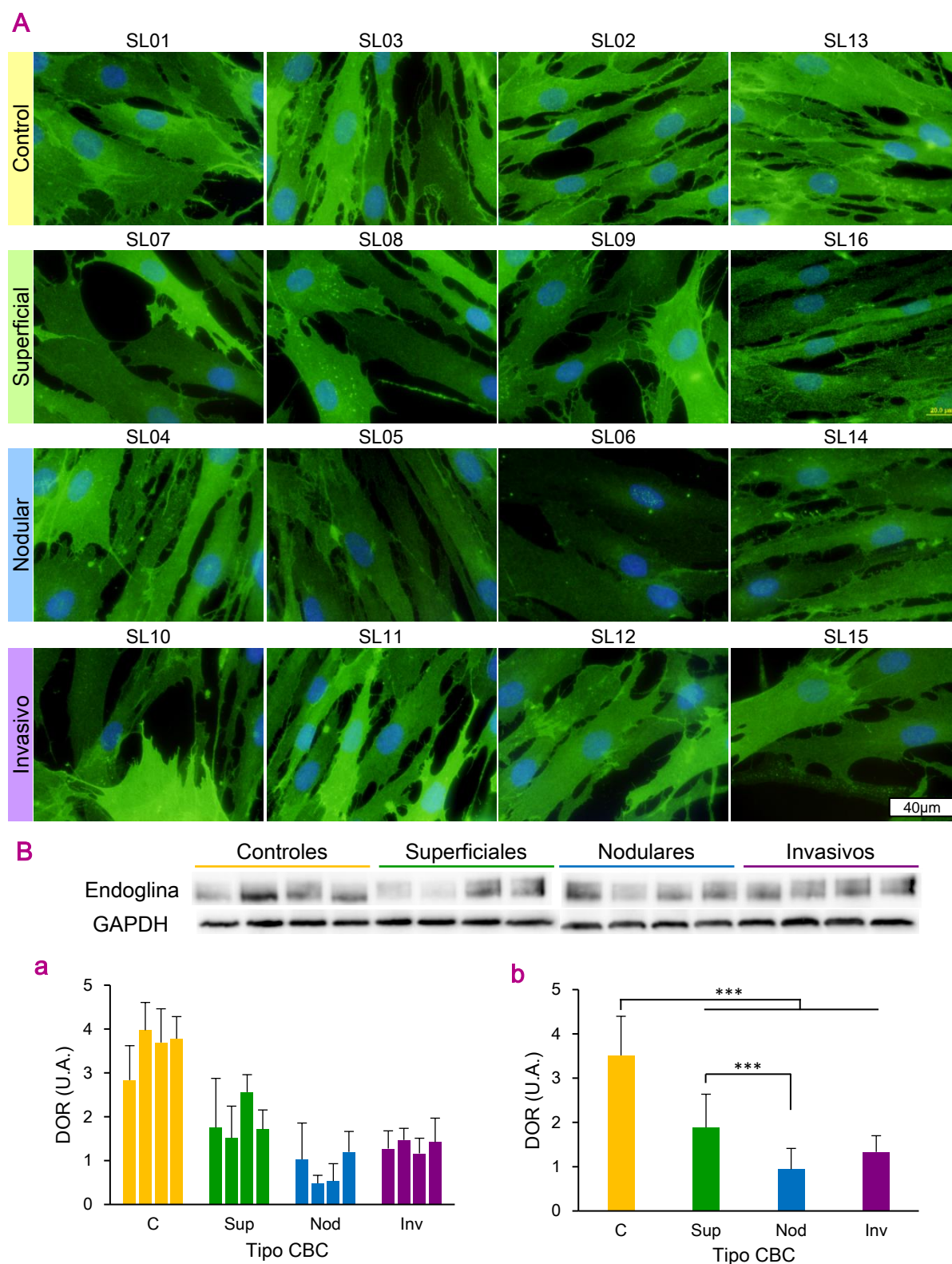
#### 4.2.2.1.5. $\alpha$ -SMA

La evaluación de  $\alpha$ -SMA mediante IF (**Fig. 46 A**) reveló que, en general, esta proteína se distribuía de forma difusa por el citoplasma. Además, formaba fibras definidas y paralelas al eje mayor del fibroblasto en determinados grupos de células. En el grupo control se encontraron escasas agrupaciones celulares con fibras definidas. Por el contrario, estas agrupaciones fueron patentes en algunas muestras de fibroblastos superficiales (SL07 y SL16), nodulares (SL05 y SL06) e invasivos (SL10, SL11 y SL15). Esta variabilidad de expresión intragrupo se apreció también en el análisis cuantitativo mediante WB (**Fig. 46 B**) en los grupos de fibroblastos de CBC, por lo que no se pudo realizar una comparación global entre los distintos grupos de fibroblastos. Los controles presentaron una expresión homogénea entre ellos.

La cuantificación a nivel de ARNm mediante RT-PCR (**Fig. 46 C**) también confirmó la variabilidad de expresión entre las distintas muestras de cada tipo de fibroblastos.

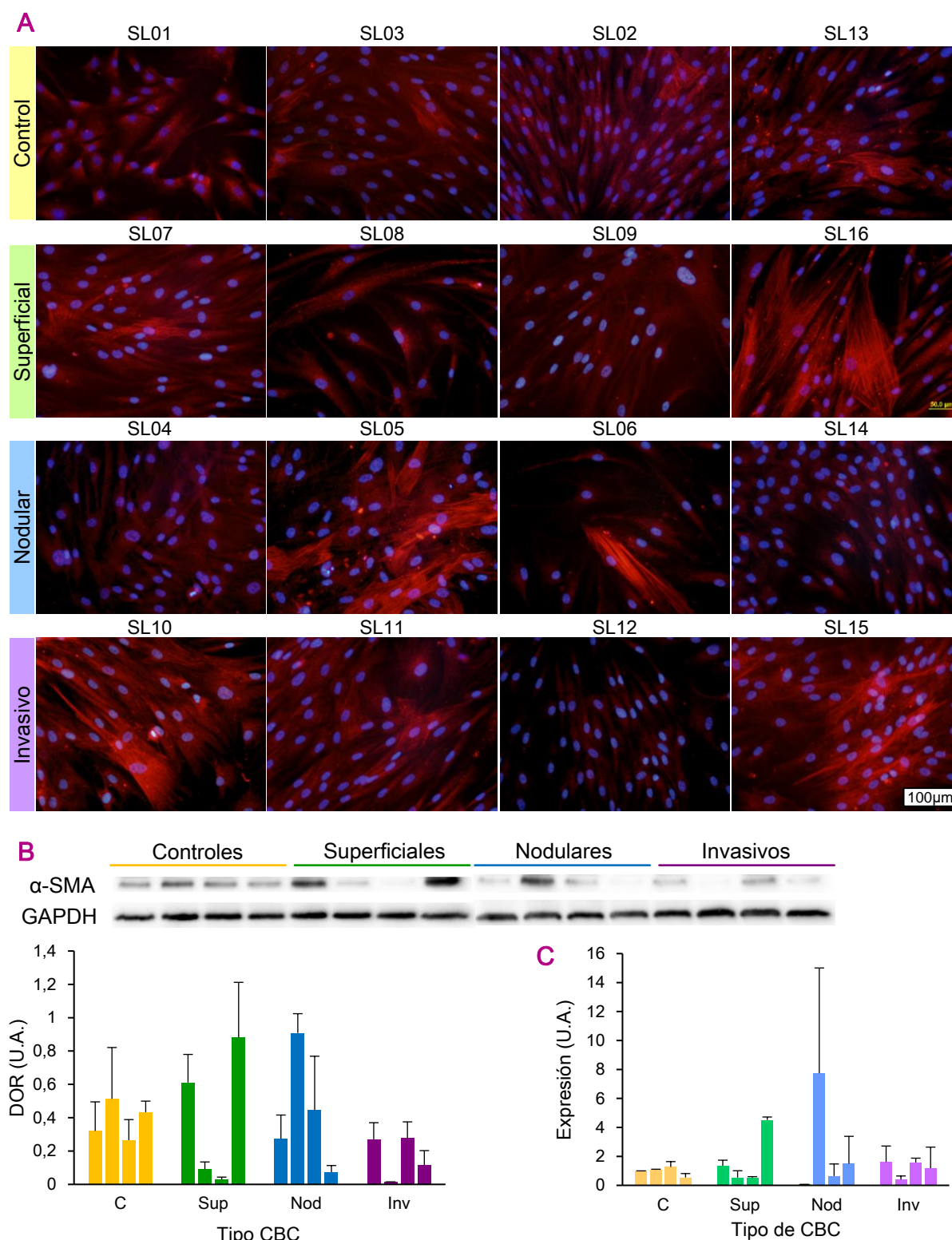
#### 4.2.2.1.6. S100A4

La sobreexpresión de la proteína S100A4 se correlaciona con metástasis. Se ha descrito su localización en núcleo, citoplasma, medio extracelular y, además, distribuida en forma de fibras en la periferia celular y a modo de red membranosa similar al RE



**Fig. 45 Localización y expresión de Endoglin en los fibroblastos de CBC.** (A) Mediante IF se vio que la proteína se expresaba de forma uniforme en el citoplasma y la membrana de los fibroblastos control, mientras que en los fibroblastos de CBCs superficiales e invasivos se expresaba más intensamente en algunas células, y se observó un punteado en SL08, SL09 y SL16. Los nodulares mostraron distintas distribuciones: en SL06 era uniforme y poco intensa, uniforme y más intensa en SL05 y SL14, y heterogénea entre las células de SL04. (B) Se muestra un experimento representativo de WB. (Ba) La expresión era similar entre las muestras de un mismo grupo. (Bb) Los fibroblastos control expresaban más Endoglin que los tres grupos de fibroblastos de CBC, y los de superficiales más que los de nodulares. (\*\*:  $P < 0,05$ ; \*\*\*:  $P < 0,01$ ).

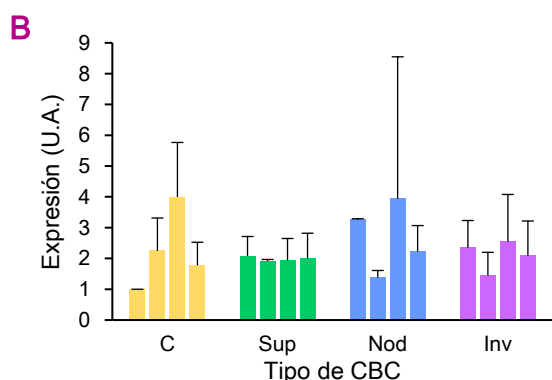
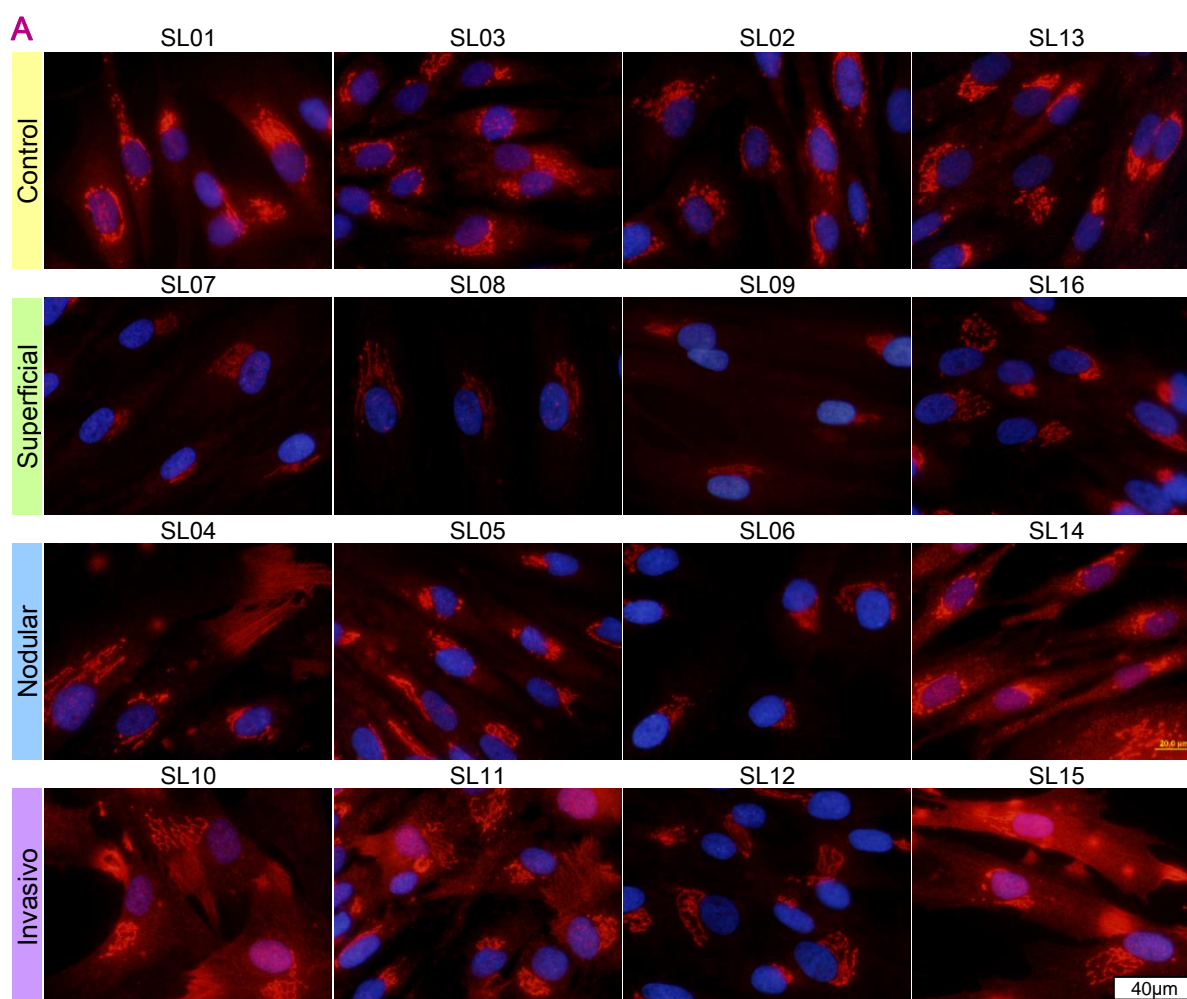




**Fig. 46 Localización y expresión de  $\alpha$ -SMA en los fibroblastos de CBC.** (A) La localización de la proteína mediante IF reveló, en general, una distribución difusa en el citoplasma y grupos de células en los que la proteína forma fibras paralelas al eje mayor del fibroblasto. En las muestras control no se encontraron apenas nidos de fibras, mientras que en los superficiales SL07 y SL16, y en los nodulares SL05 y SL06 se observaron diversos acúmulos. (B) En la cuantificación de la proteína mediante WB se observó la misma variabilidad de expresión: los superficiales SL07 y SL16, y el nodular SL05 mostraron mayor expresión; mientras que el invasivo SL11 apenas mostró expresión de la proteína. Se muestra un experimento representativo. (C) A nivel de ARNm, se confirmó la variabilidad de expresión observada mediante WB. Se muestran los datos de RT-PCR relativizados al control SL01.

alrededor del núcleo. En tejidos sanos se ha visto expresada en fibroblastos y células endoteliales, entre otros tipos celulares (Mandinova *et al.*, 1998; Andersen *et al.*, 2011).

Las observaciones realizadas mediante IF (**Fig. 47 A**) revelaron una distribución reticular cercana al núcleo en los fibroblastos control y en los de CBCs superficiales. Este mismo patrón se apreció, en general, en los fibroblastos de los CBCs nodulares, en los que también se apreció una distribución periférica fibrilar de la proteína en SL04, y dispersa por el citoplasma en SL05 y SL14. En cuanto a los fibroblastos de CBC invasivo, S100A4 presentó una distribución tipo RE y formando fibras en la periferia celular, exceptuando SL12 en la que no se observaron dichas fibras.



**Fig. 47 Localización y expresión de S100A4 en los fibroblastos de CBC.** (A) Mediante IF, los fibroblastos control y de CBC superficial mostraron una distribución de la proteína similar a la del RE. En los nodulares, además de la red tipo RE, SL04 mostró una localización periférica en forma de fibras, y SL05 y SL14 la tenían difusa en el citoplasma. Todos los invasivos mostraron la proteína en la distribución tipo RE y, excepto SL12, en fibras en la periferia. (B) La expresión evaluada mediante RT-PCR, se representan los datos relativizados a la muestra control SL01. No se encontraron diferencias significativas entre los distintos grupos (datos no mostrados).

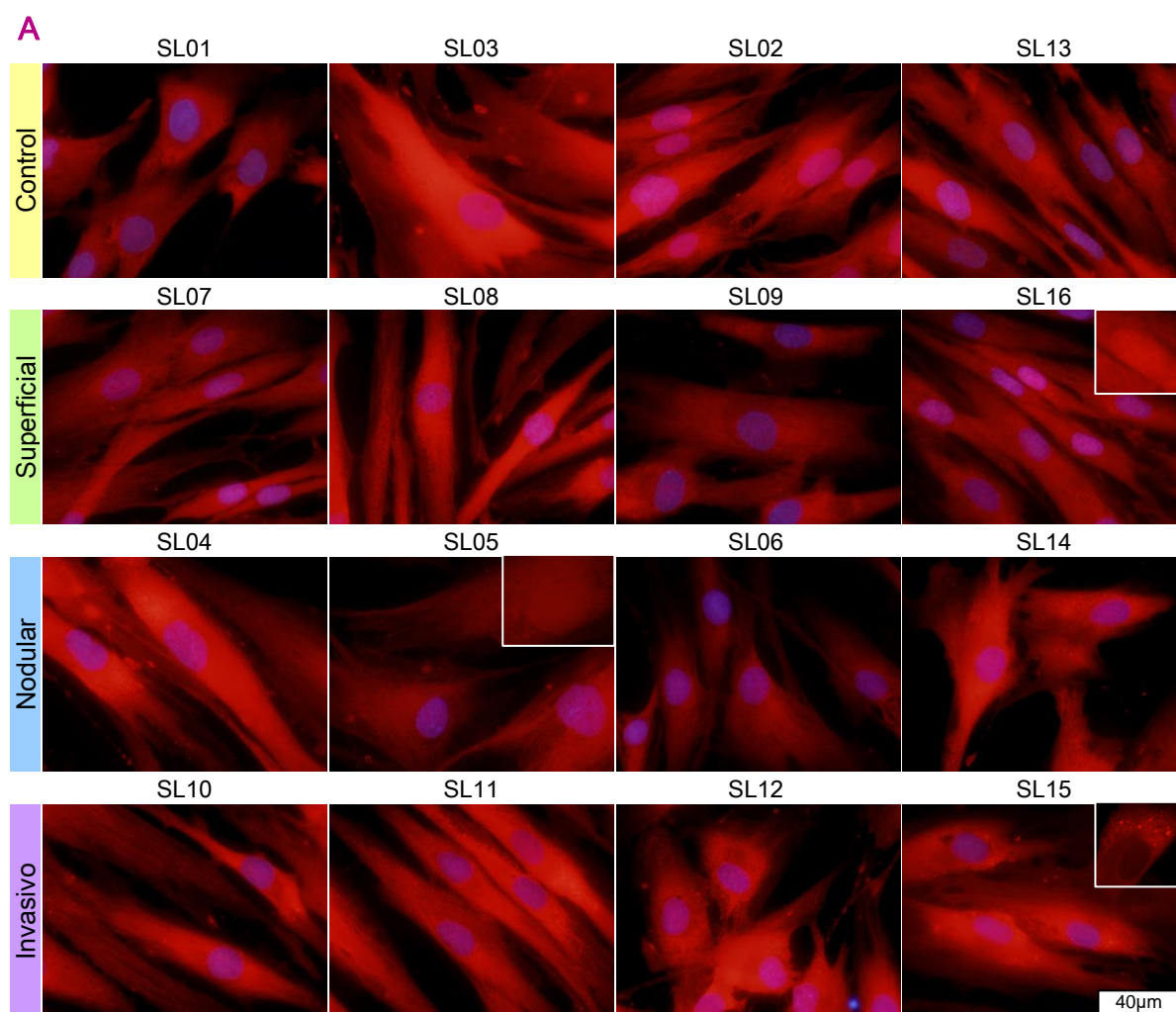


Los estudios de RT-PCR (**Fig. 47 B**) revelaron que no existían diferencias significativas entre los distintos tipos de CBC (datos no mostrados).

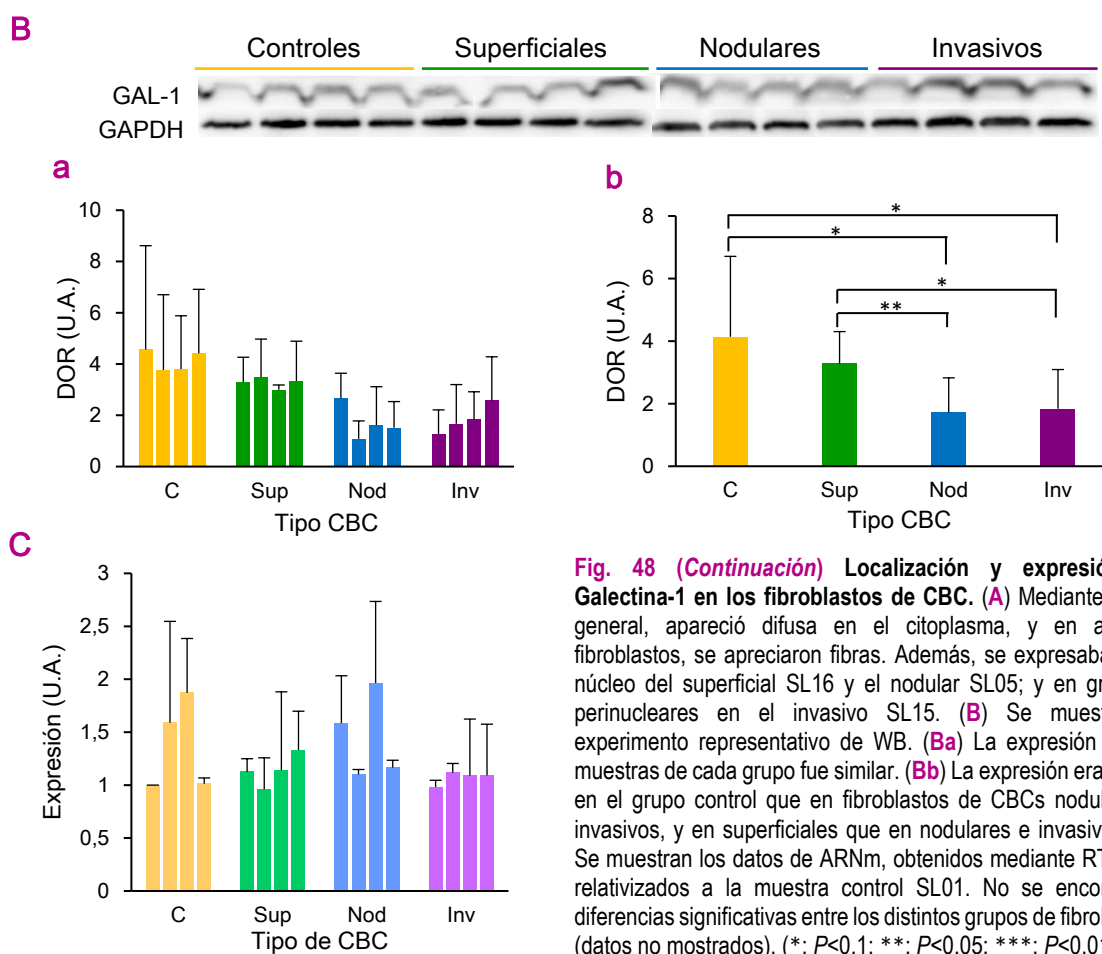
#### 4.2.2.1.7. Galectina-1

La GAL-1 es una proteína citosólica de unión a  $\beta$ -galactosidasa involucrada en mecanismos que regulan la actividad de las células malignas. El incremento de expresión de GAL-1 se ha correlacionado con numerosos procesos de progresión tumoral, como agregación celular-formación del tumor, metástasis, angiogénesis y apoptosis (Cousin y Cloninger, 2016).

El estudio de GAL-1 por IF (**Fig. 48 A**) mostró una señal difusa de la proteína en el citoplasma de todas las células. Además, en todos los cultivos, se apreció su distribución a modo de fibras en algunas de las células. En el caso del superficial SL16 y el nodular SL05 se observó también expresión a nivel nuclear. Además, en el invasivo SL15, se visualizó una distribución en forma de gránulos perinucleares.



**Fig. 48** Localización y expresión de Galectina-1 en los fibroblastos de CBC.



El análisis de expresión de la proteína mediante WB reveló homogeneidad en la expresión de GAL-1 a nivel intragrupo (**Fig. 48 Ba**). Los fibroblastos control presentaron una expresión significativamente mayor que los fibroblastos de CBC nodular ( $P<0,05$ ) e invasivo ( $P<0,1$ ) (**Fig. 48 Bb**). No se encontraron diferencias entre el grupo control y superficial, pero sí entre el superficial y el nodular ( $P<0,01$ ), y el superficial y el invasivo ( $P<0,05$ ).

La evaluación mediante RT-PCR (**Fig. 48 C**) no reveló diferencias significativas entre los tipos de fibroblastos de CBC (datos no mostrados), siendo muy homogénea entre todas las muestras.

#### 4.2.2.1.8. MMPs

Las MMPs están tradicionalmente relacionadas con la remodelación de la MEC y, en particular, con la invasión tumoral y la angiogénesis (Taguchi *et al.*, 2014; Shay *et al.*, 2015).

La **MMP-1** está estrechamente relacionada con la proteólisis pericelular - componentes de la MEC, proteínas transmembrana y factores solubles- y la de sustratos intracelulares, como quinasas de adhesión focal (Kozioł *et al.*, 2012). Los resultados obtenidos a nivel de ARNm mediante RT-PCR (**Fig. 49 A**) de su secuencia preamplificada, mostraron variabilidad de expresión en las distintas muestras de cada tipo de CBC pero, en general, los fibroblastos procedentes de CBC mostraron una mayor expresión de MMP-1 que los controles.

La **MMP-9** es secretada por células endoteliales y fibroblastos y, concretamente, se ha visto sobreexpresada en células endoteliales de nichos premetastásicos (Taguchi *et al.*, 2014; Shay *et al.*, 2015). En los resultados del análisis de RT-PCR (**Fig. 49 B**) de su secuencia preamplificada, se observó una expresión heterogénea intragrupo en los fibroblastos de CBC. Aunque no se observaron diferencias significativas entre los distintos grupos de fibroblastos (datos no mostrados), cabe mencionar que la mayoría de fibroblastos de CBCs presentaron niveles de este marcador superiores a los de los controles. Esta MMP, además, se analizó por IF (**Fig. 49 C**), observándose una señal difusa en todos los fibroblastos, tanto sanos como provenientes de CBC.

### 4.2.3. Evaluación del estrés oxidativo en fibroblastos de CBCs

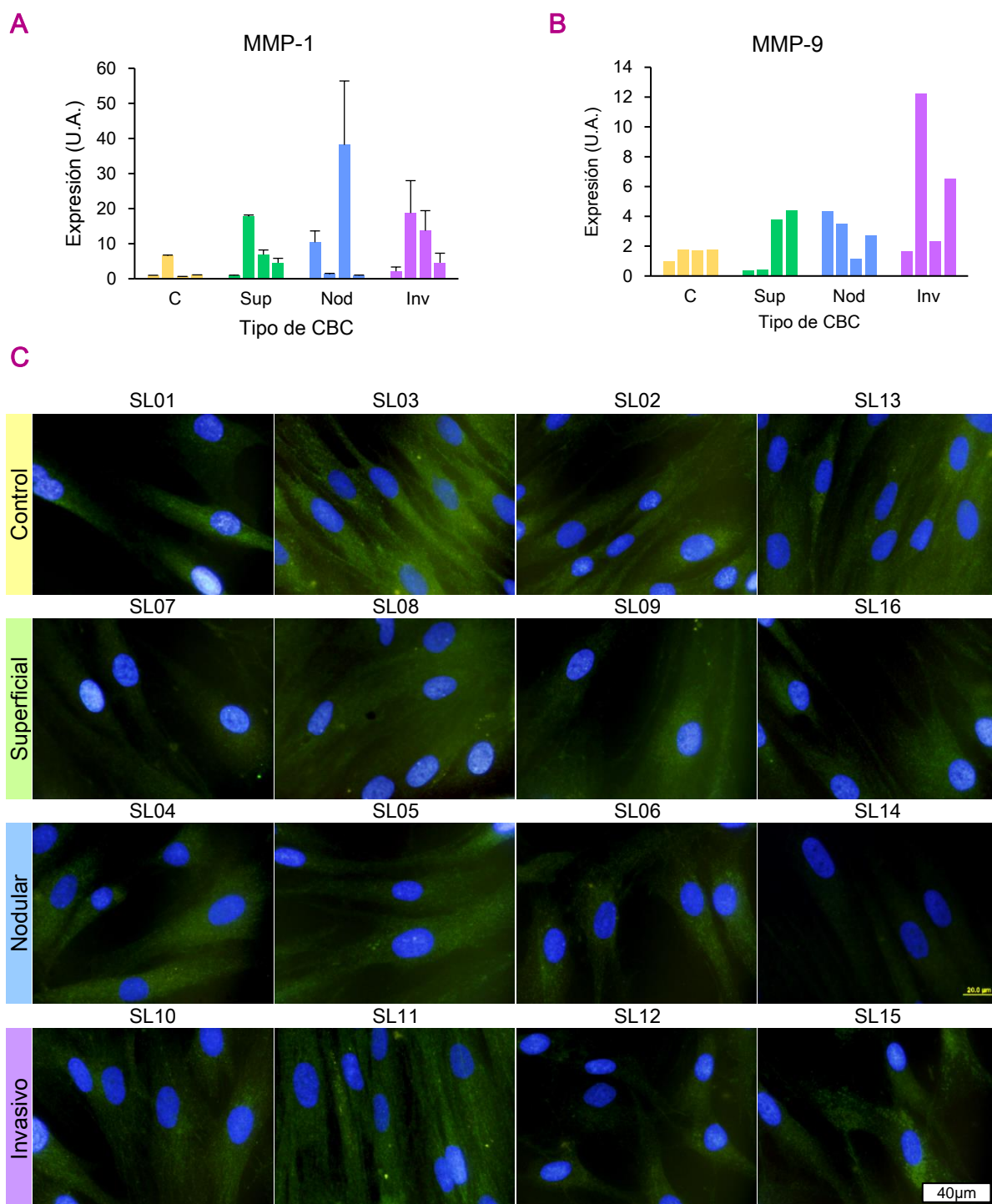
#### 4.2.3.1. Producción de ROS

En la **Fig. 50** se muestran los resultados de la medida de los niveles de ROS en los fibroblastos controles y procedentes de CBCs, obtenidos mediante citometría de flujo, empleando la sonda DHF-DA. En general, los fibroblastos de CBCs superficiales y nodulares presentaron un nivel basal de ROS superior al de los fibroblastos control, excepto una muestra de cada grupo (SL08 y SL05) (**Fig. 50 A**). Los fibroblastos procedentes de CBCs invasivos mostraron niveles similares a los controles. En la **Fig. 50 B** se muestra la comparativa entre los distintos grupos de fibroblastos retirando las muestras SL08 y SL05. Se comprobó que los fibroblastos de CBCs superficiales y nodulares presentaban niveles de ROS significativamente superiores a los de los fibroblastos control ( $P < 0,1$ ).

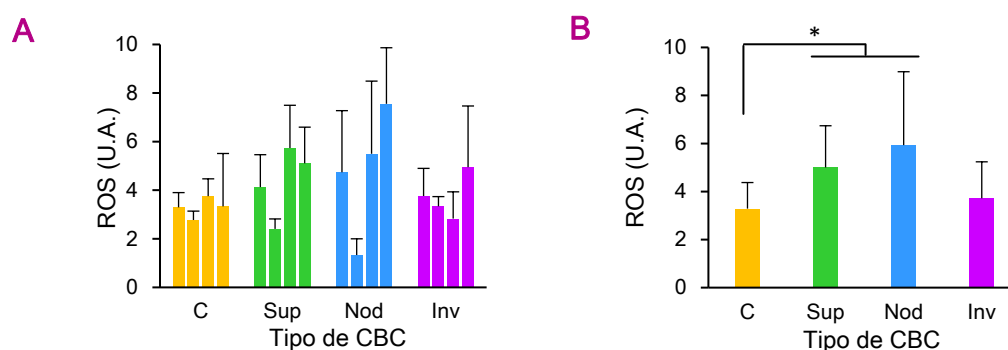
#### 4.2.3.2. Estudio de genes relacionados con el estrés oxidativo

Teniendo en cuenta los resultados de producción de ROS, los datos de la bibliografía que apoyan que los CAFs muestran niveles superiores de las mismas (Chan *et al.*, 2017), y el papel de éstas en el proceso de progresión tumoral, a continuación se evaluó la expresión de un panel de genes relacionados con el estrés oxidativo en las 16

muestras de fibroblastos: 4 controles y 4 procedentes de cada tipo de CBC (superficial, nodular e invasivo).



**Fig. 49 Expresión de MMPs en fibroblastos de CBC.** Se representan los datos de ARNm, analizado mediante RT-PCR, para MMP-1 (A) y MMP-9 (B), relativizados a la muestra control SL01. En MMP-9 se representa la media de dos datos. En general, la expresión de ambas era mayor en los fibroblastos de CBCs que en los control. No se observaron diferencias significativas entre los distintos grupos (datos no mostrados). (C) El estudio de la localización de la MMP-9 mediante IF, reveló una distribución difusa en todos los fibroblastos.



**Fig. 50 Producción de ROS por citometría de flujo.** (A) El estudio del nivel basal de ROS de los CAFs mediante citometría de flujo reveló que, la mayoría de superficiales y nodulares poseían niveles superiores a los control, excepto el superficial SL08 y el nodular SL05. El grupo invasivo tenía niveles similares a los fibroblastos control. (B) En la comparativa entre grupos, retirando las muestras SL08 y SL05, se observó que superficiales y nodulares presentaban niveles superiores de ROS respecto a los control.

En la **Tabla 9** se muestran los genes estudiados y, en aquellos que resultaron alterados de forma significativa ( $P < 0,1$ ), se indica el *fold-change*, es decir, el nivel de cambio en la expresión con respecto al grupo control. La sobreexpresión del gen con respecto al control aparece marcada en rojo, mientras que la subexpresión se indica en verde. Se usaron como controles los genes *ACTB* ( $\beta$ -actina), *B2M* ( $\beta$ -2-microglobulin), *GAPDH* (Gliceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), *HPRT1* (Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1) y *RPLP0* (Ribosomal Protein Large P0) para la relativización de la expresión.

Se hallaron genes que estaban específicamente alterados en los fibroblastos procedentes de un único tipo de CBC. En los fibroblastos de superficiales *RNF7* se encuentra subexpresado; en los de nodulares *ALOX12*, *ATOX1*, *OXSRI* y *STK25* sobreexpresados; y en los de invasivos *VIMP* sobreexpresado y *GPX1*, *NCF1* y *NOS2* subexpresados.

Los genes alterados en los fibroblastos de dos de los tipos de CBC fueron: en superficiales y nodulares, subexpresados *PRDX2* y *PTGS1*; en superficiales e invasivos, sobreexpresados *BNIP3* y *PRDX4*, y subexpresado *PRDX3*; y en nodulares e invasivos, sobreexpresados *FTH1*, *GCLM* y *GSS*.

Los genes *HMOX1* y *PNKP* se sobreexpresaron en los CAFs de los tres tipos de CBC, y los genes *DHCR24*, *GCLC*, *PDLIM1* y *UCP2* se subexpresaron.

Símbolo	Proteína	Tipo de CBC		
		Superficial	Nodular	Invasivo
ALB	Albumin			
ALOX12	Arachidonate 12-lipoxygenase		1,77	
AOX1	Aldehyde oxidase 1			
APOE	Apolipoprotein E			
ATOX1	Antioxidant protein 1 homolog (yeast)		1,22	
BNIP3	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3	1,72		1,32
CAT	Catalase			



CCL5	Chemokine (C-C motif) ligand 5			
CCS	Copper chaperone for superoxide dismutase			
CYBB	Cytochrome b-245, beta polypeptide			
CYGB	Cytoglobin			
DHCR24	24-dehydrocholesterol reductase	-1,93	-1,97	-2,06
DUOX1	Dual oxidase 1			
DUOX2	Dual oxidase 2			
DUSP1	Dual specificity phosphatase 1			
EPHX2	Epoxide hydrolase 2, cytoplasmic			
EPX	Eosinophil peroxidase			
FOXM1	Forkhead box M1			
FTH1	Ferritin, heavy polypeptide 1		1,77	1,56
GCLC	Glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit	-2,68	-1,92	-2,33
GCLM	Glutamate-cysteine ligase, modifier subunit		1,39	1,26
GPX1	Glutathione peroxidase 1			-1,54
GPX2	Glutathione peroxidase 2 (gastrointestinal)			
GPX3	Glutathione peroxidase 3 (plasma)			
GPX4	Glutathione peroxidase 4 (phospholipid hydroperoxidase)			
GPX5	Glutathione peroxidase 5 (epididymal androgen-related protein)			
GPX6	Glutathione peroxidase 6 (olfactory)			
GPX7	Glutathione peroxidase 7			
GSR	Glutathione reductase			
GSS	Glutathione synthetase		1,15	1,17
GSTP1	Glutathione S-transferase pi 1			
GSTZ1	Glutathione transferase zeta 1			
GTF2I	General transcription factor Iii			
HO-1	Heme oxygenase (decycling) 1	2,44	2,78	3,19
HSPA1A	Heat shock 70kDa protein 1A			
KRT1	Keratin 1			
LPO	Lactoperoxidase			
MB	Myoglobin			
MBL2	Mannose-binding lectin (protein C) 2, soluble			
MGST3	Microsomal glutathione S-transferase 3			
MPO	Myeloperoxidase			
MPV17	MpV17 mitochondrial inner membrane protein			
MSRA	Methionine sulfoxide reductase A			
MT3	Metallothionein 3			
NCF1	Neutrophil cytosolic factor 1			-2,20
NCF2	Neutrophil cytosolic factor 2			
NOS2	Nitric oxide synthase 2, inducible			-3,32
NOX4	NADPH oxidase 4			
NOX5	NADPH oxidase, EF-hand calcium binding domain 5			
NQO1	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1			
NUDT1	Nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 1			
OXR1	Oxidation resistance 1			
OXSRI	Oxidative-stress responsive 1		1,39	
PDLIM1	PDZ and LIM domain 1	-2,46	-2,15	-2,03
PNKP	Polynucleotide kinase 3'-phosphatase	1,32	1,23	1,39
PRDX1	Peroxiredoxin 1			
PRDX2	Peroxiredoxin 2			
PRDX3	Peroxiredoxin 3	-1,46	-1,40	
PRDX4	Peroxiredoxin 4	-1,24		-1,26
PRDX5	Peroxiredoxin 5	1,37		1,22
PRDX6	Peroxiredoxin 6			
PREX1	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate-dependent Rac exchange factor 1			
PRNP	Prion protein			
PTGS1	Prostaglandin-endoperoxide synthase 1 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)	-3,40	-2,56	
PTGS2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)			



PXDN	Peroxidasin homolog ( <i>Drosophila</i> )			
RNF7	Ring finger protein 7	-1,21		
SCARA3	Scavenger receptor class A, member 3			
VIMP	Selenoprotein S			1,59
SEPP1	Selenoprotein P, plasma, 1			
SFTPD	Surfactant protein D			
SIRT2	Sirtuin 2			
SOD1	Superoxide dismutase 1, soluble			
SOD2	Superoxide dismutase 2, mitochondrial			
SOD3	Superoxide dismutase 3, extracellular			
SQSTM1	Sequestosome 1			
SRXN1	Sulfiredoxin 1			
STK25	Serine/threonine kinase 25		1,27	
TPO	Thyroid peroxidase			
TTN	Titin			
TXN	Thioredoxin			
TXNRD1	Thioredoxin reductase 1			
TXNRD2	Thioredoxin reductase 2			
UCP2	Uncoupling protein 2 (mitochondrial, proton carrier)	-7,82	-9,98	-7,29

**Tabla 9** Análisis de expresión de genes relacionados con estrés oxidativo. Se estudiaron mediante *array* diversos genes relacionados con estrés oxidativo en CAFs. Se indica el gen, la proteína y el *fold-change* respecto al grupo de fibroblastos control. En rojo se señalan los genes sobreexpresados y en verde los subexpresados ( $P < 0,1$ ).

A partir de estos resultados de expresión alterada, se seleccionaron genes concretos con el fin de confirmar dichos resultados. Estos genes fueron: *HO-1*, por ser el más sobreexpresado y estar alterado en todos los grupos de fibroblastos de CBC; *UCP2*, el más subexpresado y alterado en todos los tipos de CBC; y *GSS*, que se sobreexpresó en los fibroblastos de CBCs nodulares e invasivos, las formas más agresivas de los tumores, por ser un gen involucrado en la síntesis del GSH, el cual está relacionado con detoxificación, progresión del cáncer y resistencia a terapias.

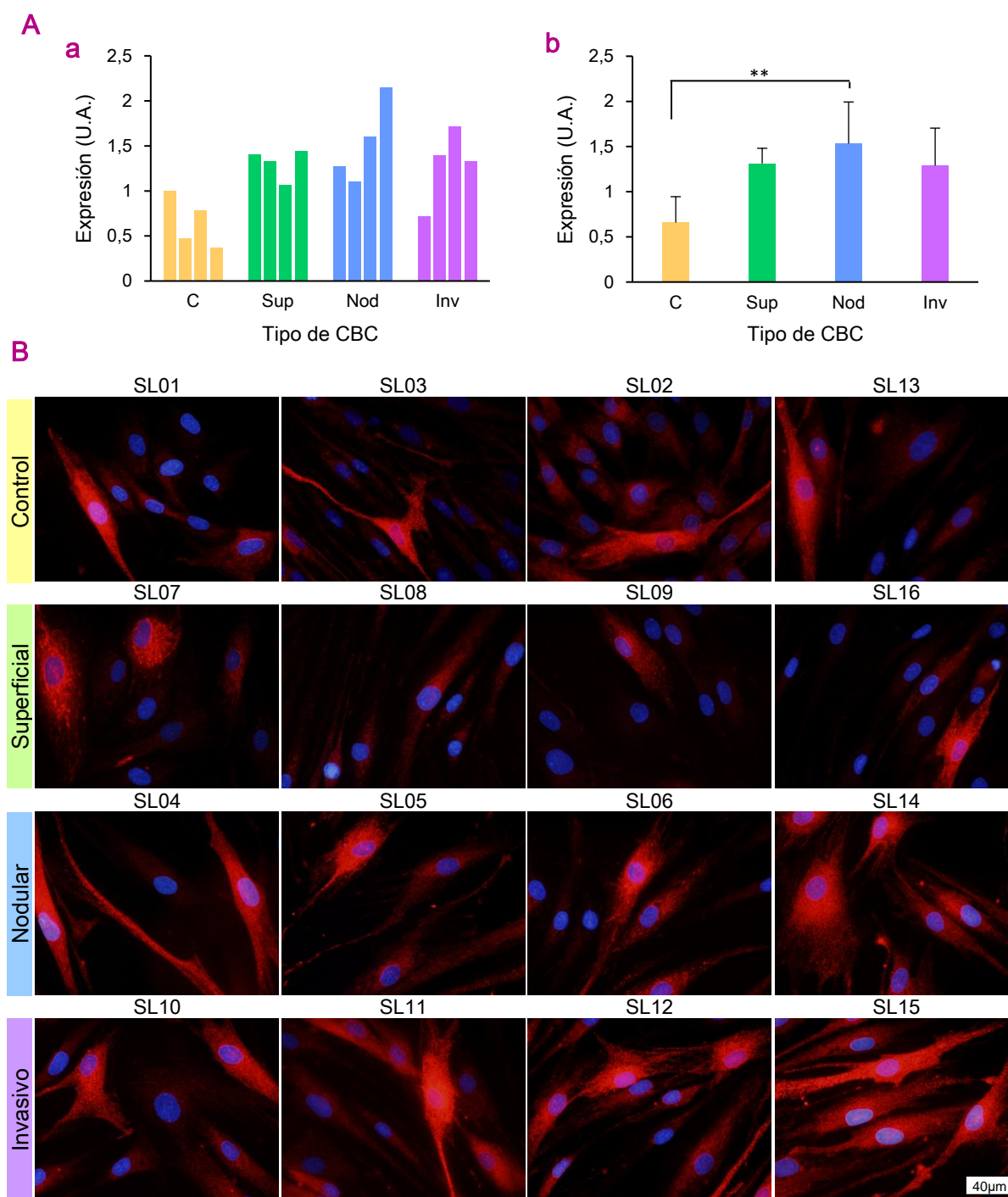
#### 4.2.3.2.1. Hemooxigenasa-1

La *HO-1*, es la forma inducible de la hemooxigenasa. Su inducción está mediada por diversas situaciones de estrés como la hipoxia o la radiación UV. Su sobreexpresión se ha descrito en numerosos cánceres humanos y se relaciona con el mal pronóstico en pacientes, ya que su expresión también es regulada de forma positiva por oncogenes. En la célula tumoral, la proteína se localiza en el citoplasma, anclada al RE, pero también se ha descrito su localización en el núcleo -correlacionándose con la progresión tumoral-, en la mitocondria y en caveolas (Raval *et al.*, 2012; Dunn *et al.*, 2014; Chau, 2015).

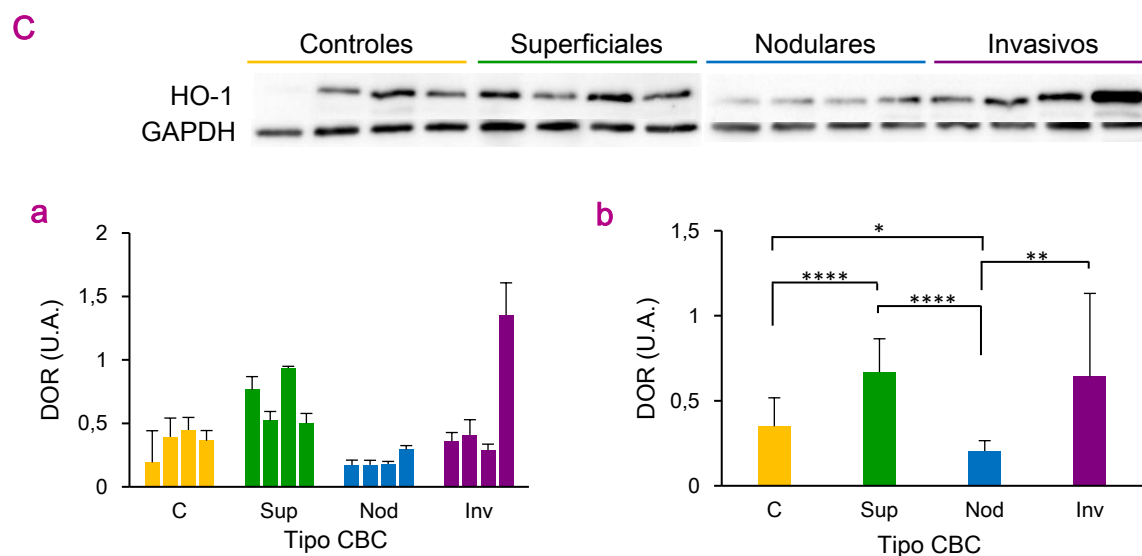
El análisis de expresión mediante *array* indicó una expresión significativamente mayor de *HO-1* en fibroblastos de CBC superficial, nodular e invasivo en comparación con los fibroblastos control (Tabla 9). La evaluación mediante RT-PCR (Fig. 51 A), reveló que el aumento sólo era significativo en los fibroblastos de CBC nodular ( $P < 0,05$ ).

El patrón de expresión y la localización de la proteína se evaluaron mediante IF (Fig. 51 B). En general, todos los tipos de fibroblastos presentaban una señal débil y difusa de *HO-1* localizada en el citoplasma. No obstante, en todos los cultivos se observaron

algunas células con una señal también citoplasmática pero más intensa. Dichas células, aparentemente, se observaron en mayor proporción en los cultivos de fibroblastos procedentes de CBCs invasivos. La cuantificación de la proteína mediante WB (**Fig. 51 C**) reveló que los fibroblastos de CBC superficial presentaban mayor expresión de HO-1 que los controles ( $P<0,001$ ), mientras que en los procedentes de nodulares, la expresión de la proteína era significativamente menor que en el resto de grupos. La muestra que presentó mayor expresión de HO-1 fue la del invasivo SL15, si bien el resto de su grupo tenía niveles similares a los de los controles.



**Fig. 51 (Parte 1)** Localización y expresión de HO-1 en los fibroblastos de CBC.



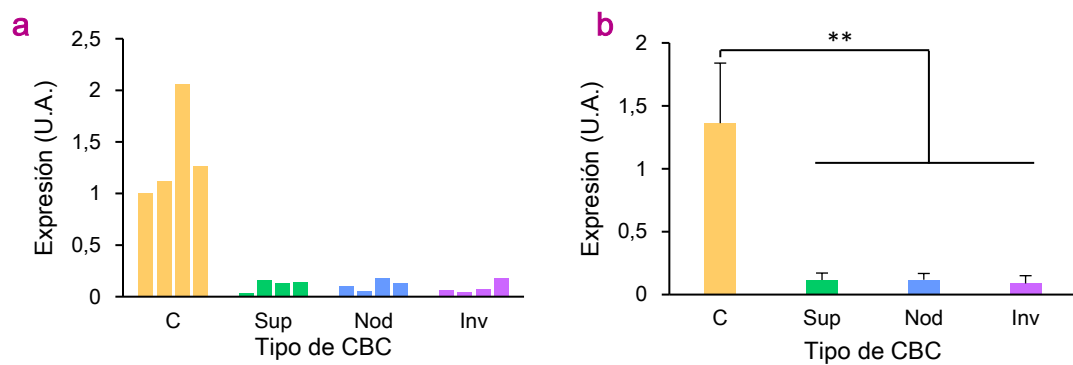
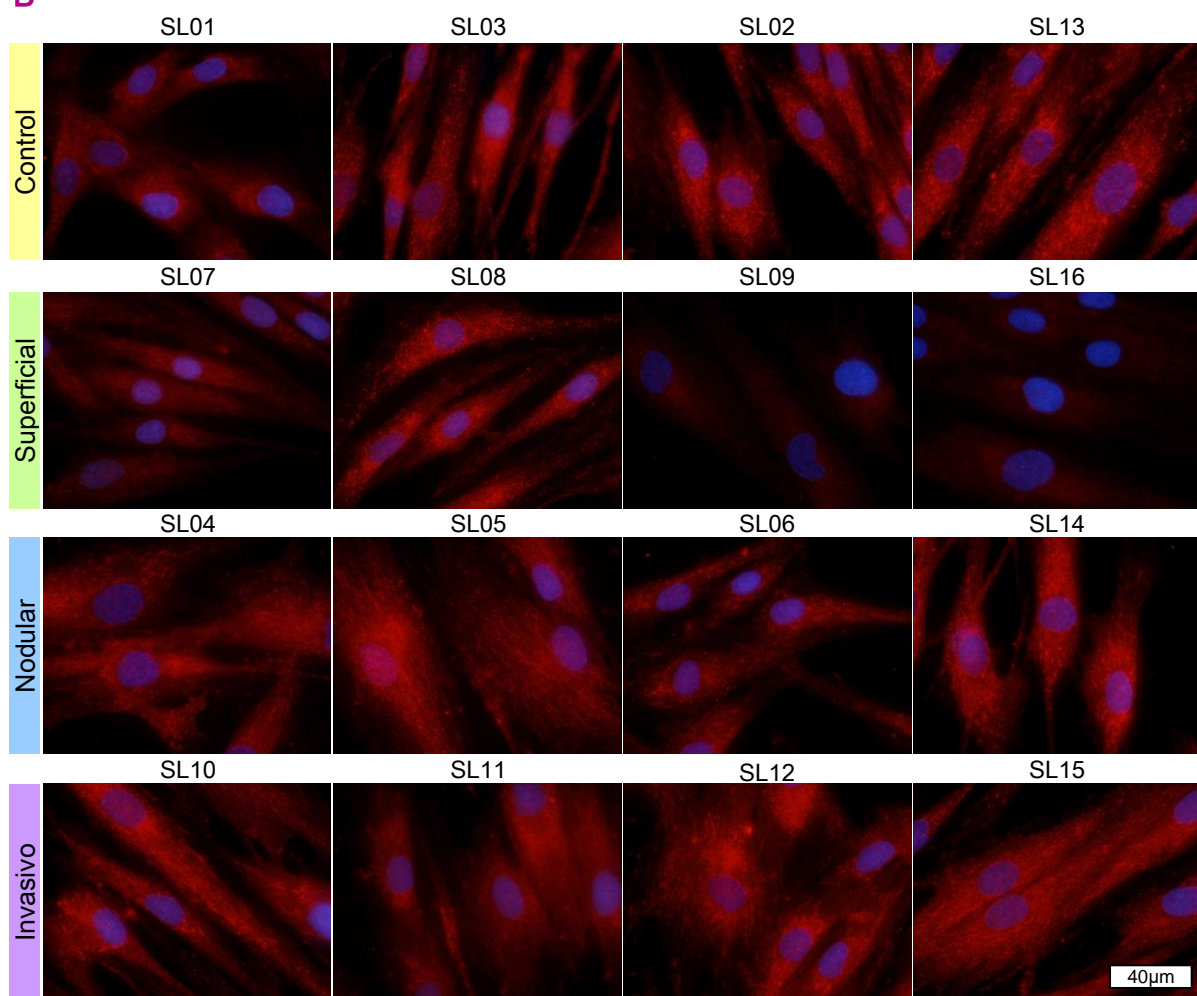
**Fig. 51 (Continuación) Expresión y localización de HO-1 en los fibroblastos de CBC.** (Aa) Se representa la media de los datos de ARNm, obtenidos mediante RT-PCR, relativizados a la muestra control SL01. Todas las muestras de CAFs expresaban niveles superiores a los controles, excepto el invasivo SL10; (Ab) siendo significativamente mayor en el grupo nodular que en el control. (B) Mediante IF, en general, las células mostraron un patrón difuso con baja fluorescencia, observándose además células con señal intensa en el citoplasma; las cuales parecen ser más numerosas en los fibroblastos procedentes de CBC invasivo, sobretodo en SL15. (C) Se muestra un experimento representativo de WB. (Ca) La expresión fue homogénea entre las muestras de un mismo grupo, excepto en invasivos, donde SL15 mostró una expresión superior. (Cb) Los nodulares presentaron menor nivel de expresión de HO-1 que el resto de grupos, siendo mayor en superficiales que en controles. (\*:  $P<0,1$ ; \*\*:  $P<0,05$ ; \*\*\*\*:  $P<0,001$ ).

#### 4.2.3.2.2. Uncoupling Protein 2

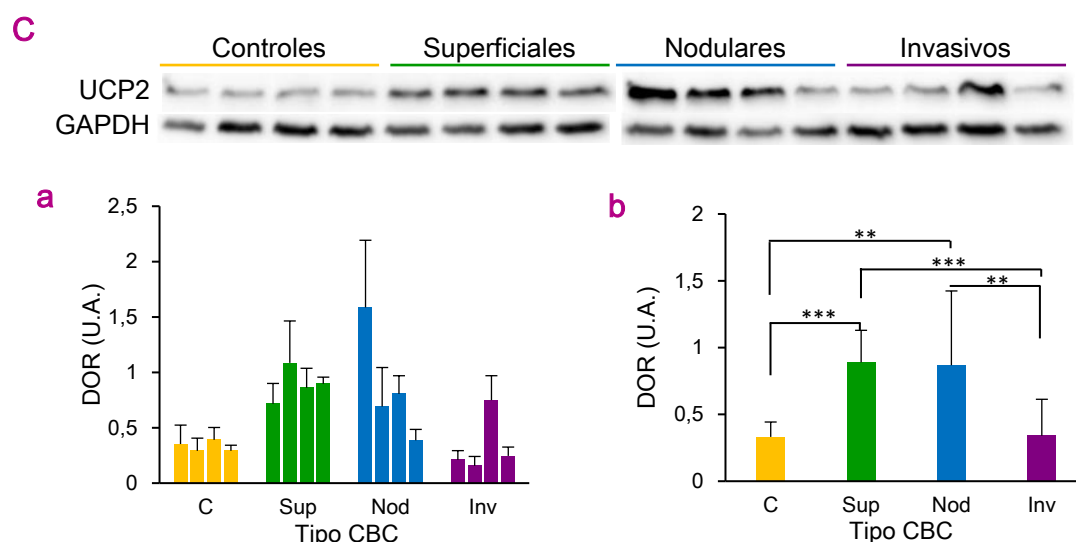
Las UCPs (*Uncoupling Proteins*) son proteínas transportadoras de aniones de la membrana interna mitocondrial. Desacoplan la fosforilación oxidativa, disipando la energía en forma de calor. Están reguladas por el estrés oxidativo. En concreto, la UCP2 se expresa en diversos tejidos y se ha sugerido que juega un papel en la disminución de la producción de ROS, inhibiendo la muerte en células tumorales (Mori *et al.*, 2008; Robbins y Zhao, 2011).

El análisis mediante *array* muestra que UCP2 está significativamente subexpresada en los fibroblastos de todos los tipos de CBC con respecto a los controles (Tabla 9). La validación a nivel de ARNm mediante RT-PCR (Fig. 52 A), confirmó estas diferencias significativas ( $P<0,05$ ).

La evaluación de UCP2 por IF (Fig. 52 B) mostró un patrón de expresión de la proteína similar en todas las muestras, difuso y en forma de red en el citoplasma. La señal era tenue en los fibroblastos de CBC superficial SL09 y SL16. La cuantificación de la expresión de la proteína mediante WB (Fig. 52 C), indicó que los fibroblastos procedentes de CBC superficial y nodular expresaban una cantidad significativamente mayor de proteína que los controles y los invasivos.

**A****B**

**Fig. 52 (Parte 1)** Expresión y localización de UCP2 en los fibroblastos de CBC.



**Fig. 52 (Continuación)** Expresión y localización de UCP2 en los fibroblastos de CBC. (Aa) Se representan los valores de expresión a nivel de ARNm, obtenidos mediante RT-PCR, relativizados a la muestra control SL01. (Ab) Los fibroblastos control expresaron niveles superiores de UCP2 que los CAFs. (B) Mediante IF, UCP2 mostraba un patrón de expresión difuso en el citoplasma y en forma de red citoplasmática en todas las muestras. Este era menos visible en los superficiales SL09 y SL16. (C) Se muestra un experimento representativo de WB. (Ca) Se observó expresión homogénea intragrupo, excepto el nodular SL04 y el invasivo SL12 que mostraron expresiones elevadas respecto al resto de muestras de su grupo. (Cb) Los superficiales y nodulares mostraron mayor expresión que controles e invasivos. (\*:  $P < 0,1$ ; \*\*:  $P < 0,05$ ; \*\*\*:  $P < 0,01$ ).

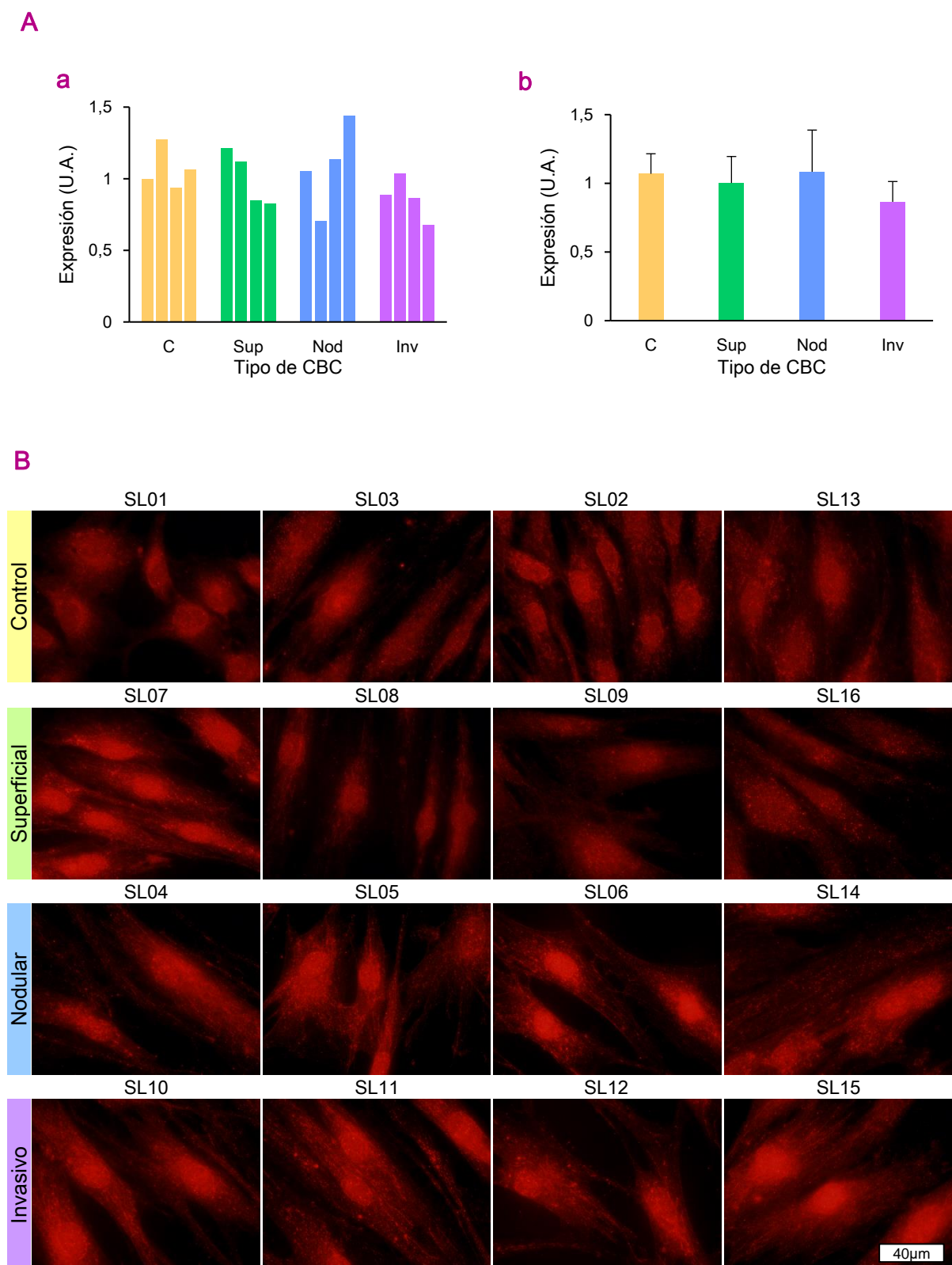
#### 4.2.3.2.3. Glutación sintetasa

El GSH es sintetizado en el citoplasma de las células por la acción de dos enzimas: la glutamato cisteína ligasa (GCL) y la GSS. Las funciones del GSH son la detoxificación de xenobióticos y el mantenimiento del estado redox de la célula, entre otras. La concentración intracelular de GSH está regulada por la inhibición de la GCL por el GSH. Así, existe un equilibrio celular entre la síntesis y el consumo de este metabolito (Ballatori *et al.*, 2009; Lu, 2013; Traverso *et al.*, 2013).

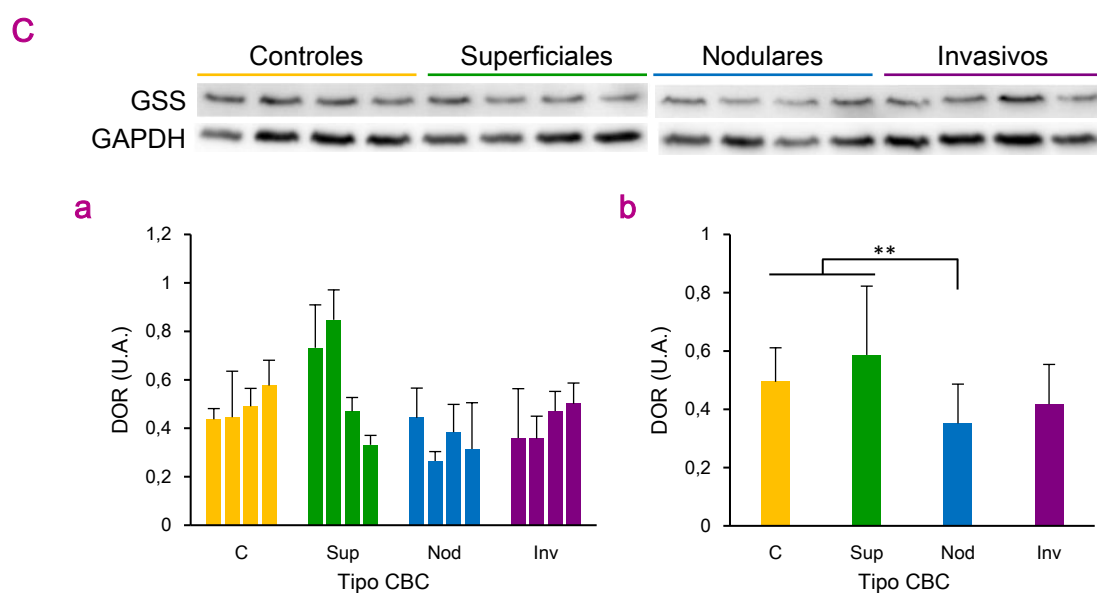
El análisis de expresión mediante *array* indicó una expresión significativamente mayor de GSS en los fibroblastos procedentes de CBCs nodulares e invasivos que en los del grupo control (Tabla 9). En la validación mediante RT-PCR (Fig. 53 A), sin embargo, no se encontraron diferencias significativas de expresión en ninguno de los tipos de CBC respecto a los controles.

En las observaciones de IF (Fig. 53 B) se apreció en todos los fibroblastos una señal de la proteína tanto difusa y reticulada en el citoplasma, como en forma de punteado en el núcleo. La señal nuclear era abundante en el superficial SL07, mientras que en el nodular SL06 se apreciaba una fluorescencia más intensa y uniforme. La cuantificación de proteína mediante WB (Fig. 53 C) reveló una menor expresión de la proteína en los fibroblastos de CBCs nodulares respecto a los de controles y superficiales ( $P < 0,05$ ).





**Fig. 53 (Parte 1)** Localización y expresión de GSS en los fibroblastos de CBC.



**Fig. 53 (Continuación) Localización y expresión de GSS en los fibroblastos de CBC.** (Aa) Se muestra la expresión a nivel de ARNm, medida mediante RT-PCR relativizada al control SL01. (Ab) No se encontraron diferencias significativas entre los grupos. (B) Mediante IF, la proteína se localizaba difusa y reticulada en el citoplasma y, además, en el núcleo de algunos fibroblastos. En el superficial SL07 se vio un punteado nuclear abundante, y en el nodular SL06 la fluorescencia era más intensa y uniforme. (C) Se muestra un experimento representativo de WB. (Ca) Se observaron niveles de expresión similares entre las distintas muestras de cada grupo, con alguna diferencia entre los superficiales. (Cb) Los CAFs de CBC nodular expresaron menos GSS que los controles y superficiales. (\*\*:  $P < 0,05$ ).

### 4.3. Efecto de los fibroblastos sobre la respuesta a TFD del CBC

En un tercer y último bloque experimental, se realizó una primera aproximación al estudio del efecto del medio condicionado de fibroblastos procedentes de CBC sobre la resistencia a TFD de las poblaciones P y 10<sup>a</sup>G de la línea CSZ de CBC murino. La línea CSZ fue escogida para este estudio por ser la que mostró un mayor nivel de resistencia de su población 10<sup>a</sup>G y ser la que presentó cambios morfológicos más evidentes. Por otra parte, se seleccionaron los fibroblastos control SL01 y los procedentes del CBC invasivo SL15, debido a que ambas muestras presentaban características propias de fibroblastos normales y de CAFs, respectivamente (**Tabla 10**). Los fibroblastos SL15, mostraron mayor expresión de Vimentina, S100A4, MMP-1 y MMP-9, y menor expresión de Endogлина y Vinculina que los SL01. Además, presentaron mayor expresión de HO-1 y menor de UCP2.

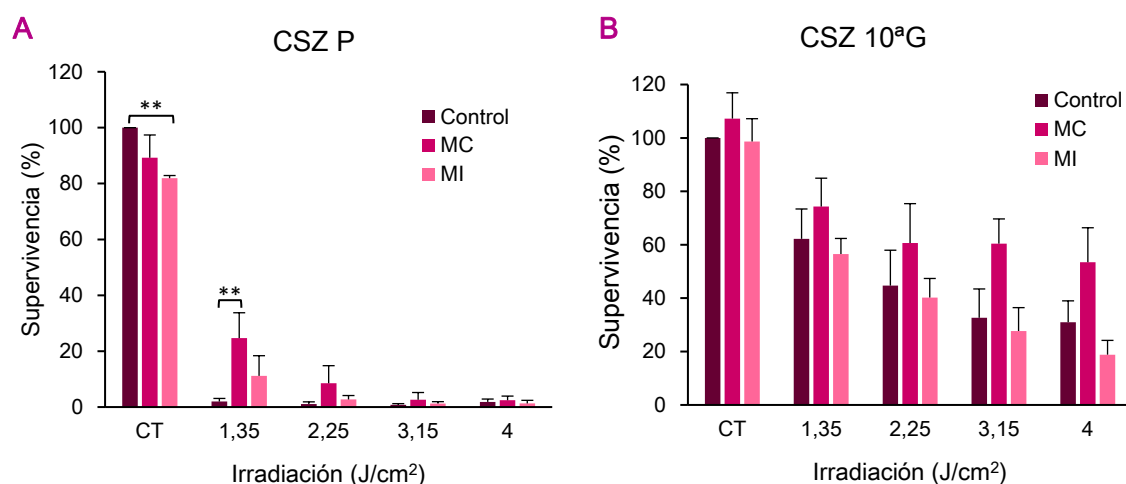
Muestra		Control SL01	Invasivo SL15	Expresión en SL15 respecto a SL01	
Técnica		IF	IF	WB	RT-PCR
Marcadores de CAFs	Vinculina	Contactos focales	Contactos focales pequeños y citoplasma	↓	
	Vimentina	Fibras citoplasmáticas poco definidas	Fibras citoplasmáticas poco definidas	↑	
	FAP-1	Núcleo y citoplasma	Núcleo y citoplasma	↓	↓
	Endoglin	Citoplasma y membrana	Citoplasma (más intenso en algunas células) membrana y punteado	↓	
	$\alpha$ -SMA	Citoplasma	Citoplasma y fibras	=	=
	S100A4	Red tipo RE	Red tipo RE, citoplasma y fibras periféricas		↑
	GAL-1	Citoplasma	Citoplasma y gránulos perinucleares	↓	=
	MMP-9	Citoplasma	Citoplasma		↑
	MMP-1				↑
Genes de estrés oxidativo	HO-1	Alguna célula con marcaje intenso en citoplasma	Todas las células con marcaje intenso en citoplasma	↑	↑
	UCP2	Citoplasma	Citoplasma	=	↓
	GSS	Difuso en la zona perinuclear	Núcleo y fibras citoplasmáticas	=	=

**Tabla 10** Expresión de marcadores de CAFs y de genes relacionados con estrés oxidativo en fibroblastos control (SL01) y de CBC invasivo (SL15). Esta tabla resume los resultados del análisis de expresión de determinados marcadores de CAFs y asociados a estrés oxidativo en muestras de fibroblastos seleccionados para los experimentos de co-cultivo. La localización intracelular y la distribución de las proteínas se evaluaron mediante IF. La cuantificación de la expresión se realizó a nivel de proteína mediante WB y a nivel de ARNm mediante RT-PCR (flecha roja: subexpresión del marcador en SL15 respecto a SL01; flecha verde: sobreexpresión del marcador en SL15 respecto a SL01; =: ausencia de diferencias de expresión).

#### 4.3.1. Efecto sobre la proliferación y la respuesta a TFD

Los ensayos de supervivencia tras los tratamientos fotodinámicos con medio condicionado de fibroblastos control (MC) y de CAFs de CBC invasivo (MI) relevaron un efecto diferencial sobre las poblaciones CSZ P y 10<sup>a</sup>G. En CSZ P (**Fig. 54 A**), el MI ocasionó una disminución de la proliferación celular ( $P < 0,05$ ), mientras que el MC no tuvo un efecto significativo sobre dicho parámetro. En cuanto a CSZ 10<sup>a</sup>G, su tasa de proliferación no se vio afectada ni por MC ni por MI (**Fig. 54 B**).

En cuanto al efecto sobre la respuesta a TFD, el MC indujo una mayor resistencia de CSZ P con dosis de 1,35 J/cm<sup>2</sup> ( $P < 0,05$ ) (**Fig. 54 A**). En CSZ 10<sup>a</sup>G, el MC también parecía inducir una mayor resistencia a TFD con todas las dosis, mientras que con MI no se observó ningún efecto sobre la supervivencia celular (**Fig. 54 B**).

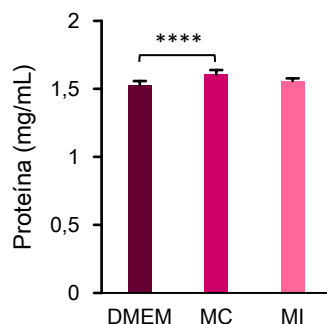


**Fig. 54** Efecto del medio condicionado por fibroblastos control y CAFs de CBC invasivo sobre la resistencia a TFD de las poblaciones P y 10ªG de la línea CSZ. **(A)** En CSZ P, el MI disminuyó la proliferación celular en la condición control. El MC indujo una mayor resistencia a la TFD con la dosis de 1,35 J/cm². **(B)** En CSZ 10ªG, el MC mostró una tendencia de inducción de la resistencia a TFD con todas las dosis de luz testadas, mientras que el MI no tuvo ningún efecto sobre la efectividad de la TFD. (\*\*:  $P < 0,05$ ).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se realizó la evaluación de algunos aspectos relacionados con los medios de cultivo condicionados que podría tener relación con la respuesta a TFD observada: concentración de proteína y actividad de MMPs en el medio, y distribución de proteínas de adhesión en las células P y 10ªG.

#### 4.3.2. Concentración de proteína total

El efecto diferencial que ejercen los medios condicionados utilizados sobre la respuesta de las células a TFD podría deberse a diferencias en el contenido total de proteína en los medios, puesto que una mayor concentración proteica podría dificultar la entrada de la droga en la célula o favorecer su expulsión a través de la bomba Abcg2 (Ogino *et al.*, 2011; Yamamoto *et al.*, 2013). Por este motivo, se procedió a realizar una medida de la concentración de proteína en los tres tipos de medio, utilizando el método del BCA (Fig. 55). Los resultados indicaron una concentración proteica significativamente mayor en el MC que en el control (DMEM 0,5 % FBS) ( $P < 0,001$ ). Sin embargo, no se observaron diferencias entre MC y MI.

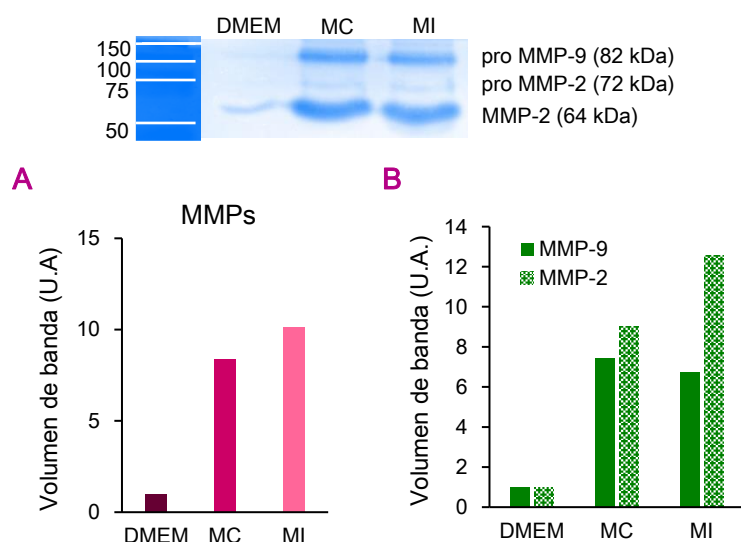


**Fig. 55** Concentración de proteína total. La concentración de proteína en el medio condicionado con fibroblastos control (MC), analizada mediante BCA, fue mayor que en el control (DMEM 0,5% FBS). (\*\*\*\*:  $P < 0,001$ ).

### 4.3.3. Actividad de MMPs

Asimismo, se procedió a estudiar la actividad de las MMPs 2 y 9 en los medios de cultivo condicionados MC y MI, en comparación al medio control DMEM 0,5 % FBS no condicionado (**Fig. 56**). El análisis se llevó a cabo mediante zimografía, una técnica que permitió evaluar tanto la actividad conjunta de ambas MMPs como la actividad de MMP-2 y MMP-9 de forma individual.

Los resultados obtenidos indicaron que la actividad conjunta de ambas MMPs era mayor en el MI que en el MC (**Fig. 56 A**). La actividad de MMP-2 fue mayor en el MI que en el MC y, en ambos medios, superior a la de MMP-9, cuya actividad fue ligeramente inferior en el MI respecto al MC (**Fig. 56 B**)

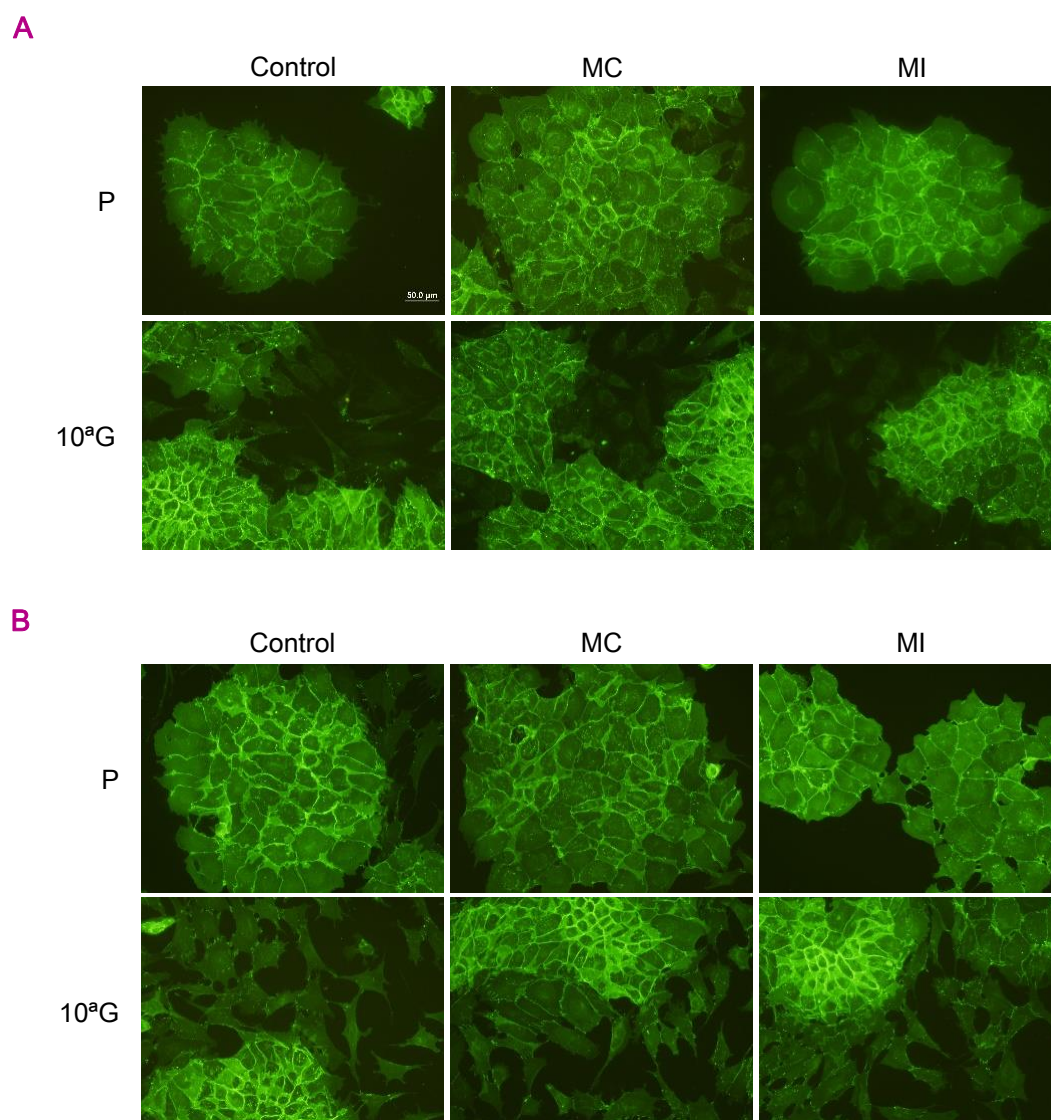


**Fig. 56 Actividad de MMPs en el medio de cultivo condicionado de fibroblastos control (MC) y CAFs de CBC invasivo (MI).** Se muestran las bandas resultantes de la zimografía. **(A)** Se representa la suma de los datos obtenidos para ambas MMPs, observándose mayor actividad en MC que en el control DMEM, y mayor en MI que en MC. **(B)** Los datos individualizados de MMP-2 y MMP-9, revelaron mayor actividad de MMP-2 en MC y MI; siendo inferior la de MMP-9 en MI respecto a MC.

### 4.3.4. Expresión de proteínas de adhesión

La expresión de las proteínas de adhesión E-cad y  $\beta$ -cat fue evaluada en CSZ P y 10<sup>a</sup>G tras la incubación de las mismas con MC y MI. Dicho análisis se efectuó mediante IF (**Fig. 57**). No se observaron diferencias en el patrón de expresión ni en la señal de fluorescencia de ninguna de estas proteínas entre las células cultivadas con DMEM 0,5 % FBS, MC o MI. Independientemente del medio de cultivo, la población P mostró una expresión homogénea de ambas proteínas, mayoritariamente en membrana, mientras que en el caso de la 10<sup>a</sup>G, las células poligonales presentaban una señal más intensa y las fibroblastoides tenían ausencia de E-cad y una señal débil de  $\beta$ -cat.





**Fig. 57** Expresión y localización de E-cadherina y  $\beta$ -catenina en CSZ con el medio condicionado de fibroblastos. El estudio mediante IF de E-cad (**A**) y  $\beta$ -cat (**B**), tras la incubación de las células con medio condicionado con fibroblastos control (MC) y de CBC invasivo (MI), no reveló diferencias respecto al control (DMEM). En general, la localización de ambas proteínas se observó en membrana y difusa en el citoplasma, siendo uniforme en las células P; mientras que las 10<sup>a</sup>G presentaron una mayor expresión en las células poligonales y ausencia de expresión de E-cad (**A**) y menor expresión de  $\beta$ -cat (**B**) en las fibroblastoides.

# 5

## Discusión

El CBC es el cáncer con mayor incidencia a nivel mundial. Aunque su mortalidad es escasa, es altamente mutilante apareciendo en zonas fotoexpuestas como la cara o las extremidades, y genera un alto coste sanitario. Dentro de las terapias aprobadas para su tratamiento, destaca la TFD, la cual, a pesar de sus ventajas y de su uso extendido, puede generar recidivas con una frecuencia relativamente elevada. Además, su eficacia varía con el tipo de CBC (Fargnoli y Peris, 2015). Por ello, es fundamental conocer los mecanismos implicados en la resistencia de CBCs a esta terapia. Dentro de los mismos, destacan aquellos relacionados con el propio tratamiento -localización y producción del FS-; con las características de las células tumorales -la adhesión, proliferación y expresión de genes implicados en el desarrollo del tumor como *p53*, *ptch* y los de la ruta *Wnt/β-cat*; con características de CMCs; y los relacionados con el ambiente tumoral, especialmente los CAFs, cuya influencia sobre la respuesta a terapias es un tema de interés en cáncer. En particular, el papel de los CAFs en la resistencia a TFD del CBC está muy escasamente estudiado.

### 5.1. Resistencia intrínseca a TFD en líneas de CBC murino

No existen líneas celulares humanas establecidas que puedan ser utilizadas como modelo de estudio de CBC, por lo que, en este trabajo, se seleccionaron las líneas murinas: ASZ, BSZ y CSZ, basándose en dos características genéticas. En primer lugar, todas ellas carecen de copias *wt* del gen *ptch* (So *et al.*, 2006), como ocurre en la mayoría de CBCs humanos, tanto espontáneos como hereditarios (Marzuka y Book, 2015). En segundo lugar, mientras que ASZ expresa el gen supresor de tumores *p53*, BSZ y CSZ, carecen del mismo (Aszterbaum *et al.*, 1999). La mutación de *P53* se ha descrito en el 50 % de los CBCs humanos, y parece ser debido, sobre todo, a la luz UV (Benjamin *et al.*, 2008; Meyer, 2009; Stamatelli *et al.*, 2011). A partir de estas líneas P se obtuvieron las correspondientes poblaciones resistentes 10<sup>a</sup>G, y mediante cultivo de tumores inducidos por inoculación de las P y 10<sup>a</sup>G en ratones inmunosuprimidos, se generaron las P T y 10<sup>a</sup>G T. Se confirmó que todas las poblaciones carecían también de copias *wt* de *ptch*, y las de BSZ y CSZ también de expresión de *p53*. Las poblaciones ASZ P y 10<sup>a</sup>G mostraron niveles de expresión de *p53* similares, pero los de 10<sup>a</sup>G T eran mayores que los de P T. Estos modelos celulares nos permitirán determinar si la expresión de este gen es un factor importante en la respuesta a TFD. En este sentido, se ha descrito respuesta diferencial a TFD en función de su expresión (mayor sensibilidad cuando se sobreexpresa, por promover apoptosis) (Yow *et al.*, 2007; Zawacka-Pankau *et al.*, 2008; Acedo y Zawacka-Pankau, 2015) o del estado mutacional del gen (Barberi-Heyob *et al.*, 2004). Sin embargo,

otros autores no han encontrado relación entre su expresión y la respuesta a TFD (Postiglione *et al.*, 2016).

Además, cada una de las líneas proviene de un CBC generado mediante un **carcinógeno** diferente: ASZ por irradiación UV, considerado el factor externo más común en el desarrollo del CBC; BSZ por rayos gamma (Gottlöber *et al.*, 1999; Li y Athar, 2016); y CSZ proviene de un CBC espontáneo, considerado el tipo más común de CBC (Mijušković, 2013; Reichrath y Rass, 2014). Estos tres modelos, por lo tanto, también permitirán comprobar si el origen del CBC determina la respuesta a TFD.

En primer lugar, tras la generación de las células de CBC murino 10<sup>a</sup>G siguiendo protocolos descritos por otros autores (Milla *et al.*, 2011) y la constatación de su mayor resistencia a TFD respecto a sus P (*fold-change* con 1,35 J/cm<sup>2</sup>: ASZ 8,44; BSZ 5,16; CSZ 1,53), se procedió a determinar las características diferenciales que pudieran estar relacionados con la mala respuesta. Las revisiones realizadas por Casas *et al.* (2011) y Zamarrón *et al.* (2015) recogen los estudios previos llevados a cabo por otros autores sobre mecanismos implicados en resistencia a TFD.

A **nivel morfológico**, las poblaciones 10<sup>a</sup>G de ASZ y BSZ mostraron una morfología más fibroblastoide que sus P, y en CSZ 10<sup>a</sup>G se observaron dos poblaciones, una similar a la P y otra fibroblastoide que se disponía rodeando a la poligonal. Los cambios hacia morfologías fibroblastoides, también han sido observados por Casas *et al.* (2006) en células LM3 de adenocarcinoma mamario murino resistentes a TFD-ALA y Milla *et al.* (2011) en células SCC-13 de CE a TFD-MAL, pudiendo indicar mayor agresividad tal y como dichos autores indican.

En relación a la distribución de las células en el **ciclo celular**, no se encontraron diferencias entre las células P y 10<sup>a</sup>G de ninguna línea, lo que concuerda con trabajos previos realizados con células SCC-13 (Milla *et al.*, 2011). Por su parte, tanto el **tamaño** como la **complejidad** (medida del *forward scatter* y *side scatter* de citometría de flujo, respectivamente) disminuyeron en las células CSZ 10<sup>a</sup>G respecto a las P, así como el tamaño en ASZ y BSZ 10<sup>a</sup>G. Sin embargo, otros autores han descrito un incremento de tamaño en las células RIF-1 de fibrosarcoma murino resistentes a TFD-Photofrin II (RIF-8A) (Luna y Gomer, 1991; Sharkey *et al.*, 1993) y en las resistentes de LM3 (Casas *et al.*, 2006). Además, se ha observado que las células de cáncer de pulmón más vulnerables a la TFD con un derivado de la benzoporfirina, eran aquellas de menor tamaño (Richter *et al.*, 1987). El aumento del tamaño también se ha observado en células de cáncer de pulmón de células pequeñas resistentes a agentes quimioterapéuticos como el cisplatino y el oxiplatino (Stordal *et al.*, 2006; McDermott *et al.*, 2014). Esta falta de concordancia entre nuestros resultados y los descritos por otros autores, podrían estar relacionados con

el tipo celular, siendo, en el caso del CBC, las células de mayor tamaño las más sensibles a TFD.

Los estudios de la **proliferación**, mostraron que ASZ (p53+) era la línea con mayor eficiencia de plaqueo, dando lugar a un mayor número de colonias, pero de menor tamaño; mientras que las colonias de BSZ y CSZ (p53-) eran de mayor diámetro, lo que indica mayor proliferación. Estos resultados pondrían de relieve el papel de *p53* en favorecer la adhesión a sustrato y en el control de la proliferación (Araki *et al.*, 2015; Kruiswijk *et al.*, 2015). La comparación en cuanto al número total de colonias entre las P y 10<sup>a</sup>G reveló que no existían diferencias para ninguna línea. En cuanto al tamaño, ASZ no mostró diferencias entre P y 10<sup>a</sup>G; mientras que BSZ y CSZ P formaron un mayor número de colonias de mayor tamaño que sus 10<sup>a</sup>G, lo que indica una mayor capacidad proliferativa. El recubrimiento de las placas con Matrigel®: estimuló la capacidad proliferativa de ASZ P y 10<sup>a</sup>G, encontrándose colonias de mayor tamaño; disminuyó el número de colonias BSZ 10<sup>a</sup>G, respecto a su P y no ocasionó diferencias en CSZ. La disminución en la eficiencia de plaqueo de las células resistentes fue también observada por Luna y Gomer (1991) en células RIF-8A, y por Casas *et al.* (2008a) en LM3. La menor capacidad de proliferación de las células resistentes podría deberse a una mayor presencia de CMCs en los cultivos, cuya tasa de proliferación es baja, lo que les conferiría resistencia a terapias (Colak y Medema, 2014). Asimismo, podría deberse a un mayor tiempo de latencia de las células 10<sup>a</sup>G, como describieron Casas *et al.* (2006) en las resistentes LM3, que conlleva a un retraso en su proliferación.

De los resultados obtenidos se puede concluir que las poblaciones 10<sup>a</sup>G de CBC murino disminuyen su tamaño, pero, en general, no varían su ciclo celular ni su complejidad. La expresión de *p53* favorece la adhesión a sustrato y controla la proliferación celular: ASZ forma más colonias pero más pequeñas que BSZ y CSZ. Además, BSZ y CSZ 10<sup>a</sup>G son menos proliferativas que sus P, por tener más CMCs o mayor latencia (BSZ). El Matrigel® aumenta la proliferación de ASZ P y 10<sup>a</sup>G y disminuye la eficiencia de plaqueo de BSZ 10<sup>a</sup>G respecto a P.

Uno de los factores a tener en cuenta en la eficacia de la TFD es la **localización subcelular** del FS, debido a que la vida media (40 ns) y el radio de acción (20 nm) del <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, principal ROS generada tras la TFD, son limitados. Por ello, las estructuras celulares cercanas al FS conforman las dianas primarias e incluyen: mitocondrias, membrana plasmática y núcleo (Dougherty *et al.*, 1998; Ji *et al.*, 2006; van Straten *et al.*, 2017). Los resultados obtenidos indican que, tras la incubación con MAL, la PpIX se localizaba en la membrana plasmática de todas las células y, además, en el núcleo de ASZ y BSZ P. Los estudios de Rosenkranz *et al.* (2000) apoyan una mayor sensibilidad a TFD, en el caso de localización nuclear del FS. Resultados previos no describen cambios en la



localización de la PpIX entre las parentales y resistentes de las células RIF-1 -con ALA o Photofrin®- (Wilson *et al.*, 1997), ni de las SCC-13, encontrándose la PpIX en la membrana plasmática (Milla *et al.*, 2011). Por su parte, la **acumulación del FS** por las células es otro factor a tener en cuenta en la respuesta a TFD, ya que son muchos los estudios que relacionan dicho parámetro con una mayor eficacia de la terapia (Agostinis *et al.*, 2011; Casas *et al.*, 2011; Dabrowski y Arnaut, 2015). En este sentido, en ASZ y BSZ no parece ser un factor fundamental, ya que no se han encontrado diferencias significativas entre sus P y 10<sup>a</sup>G, lo que concuerda con los resultados obtenidos en células SCC-13 (Milla *et al.*, 2011). Sin embargo, en CSZ, la producción de PpIX sí podría ser un factor de resistencia a TFD, ya que en 10<sup>a</sup>G fue significativamente menor que en P y la señal de fluorescencia era menos intensa en la población fibroblastoide que en la poligonal, lo que podría conferirles una mayor resistencia. Apoyando estos resultados, se ha descrito que queratinocitos primarios de ratón tratados con ALA acumulaban más PpIX, que células tumorales Pam212 proliferativas e indiferenciadas (Ortel *et al.*, 1998). Este hecho podría explicar las diferencias observadas entre las poblaciones de CSZ 10<sup>a</sup>G, siendo la fibroblastoide la menos diferenciada. Por tanto, la mayor sensibilidad a TFD de las P estaría favorecida, en ASZ y BSZ por la localización nuclear de la PpIX y en CSZ por su mayor producción.

Los resultados de este trabajo indican que las poblaciones P y 10<sup>a</sup>G de todas las líneas de CBC presentaban **capacidad de generación de tumores** en modelos murinos, tras su inoculación con Matrigel® que genera un ambiente adecuado para ello. Además, los tumores formados a partir de las 10<sup>a</sup>G eran mayores que los originados a partir de las P, lo que podría apuntar hacia una mayor población de CMCs en las resistentes (Colak y Medema, 2014). Cabe destacar el mayor tiempo de latencia de las BSZ, que podría deberse a la menor adhesión de las BSZ 10<sup>a</sup>G en Matrigel®, observada en los estudios de clonogenicidad. En general, los tumores originados a partir de las células P de todas las líneas, mostraron un patrón mixto con células fusiformes y de tipo osteosarcoma. Las ASZ 10<sup>a</sup>G generaron el mismo tipo de tumores que las P; las BSZ 10<sup>a</sup>G formaron tumores con células fusiformes o tipo hemangiopericitomatoso (vascularizadas) y las CSZ 10<sup>a</sup>G tumores mixtos con los tres tipos de morfología -fusiforme, osteosarcoma y hemangiopericitomatoso-. Todos los tumores mostraron invasión del músculo y del tejido adiposo no encontrándose diferencias entre los P y los 10<sup>a</sup>G. Es de resaltar la formación de osteoide en los tumores generados a partir de BSZ P, CSZ P y CSZ 10<sup>a</sup>G; los mismos presentan similitudes histológicas a un subtipo de CBC humano denominado carcinosarcoma de células basales. Estos tumores, muy raros en pacientes (sólo se han descrito 47 casos), poseen un componente de CBC y un componente sarcomatoso indiferenciado, en su mayoría, osteosarcoma; su capacidad de metástasis es equivalente

a la de los CBCs convencionales (Zbacnik *et al.*, 2015). Resultados similares a los de este trabajo, fueron obtenidos con células SCC-13, siendo mayores los tumores generados a partir de las células resistentes (Gilaberte *et al.*, 2014).

Asimismo, cómo se ha mencionado anteriormente, las **CMCs** podrían ser las responsables de algunas de las características observadas en las 10<sup>a</sup>G relacionadas con resistencia: menor proliferación, escapando así a terapias dirigidas a células con una alta tasa de proliferación; menor acumulación de PpIX en CSZ 10<sup>a</sup>G por estar en un estado más indiferenciado; y generación de tumores de mayor tamaño (Agathocleous y Harris, 2013; Colak y Medema, 2014; Abbaszadegan *et al.*, 2017). Para confirmar la presencia de CMCs en los cultivos, se evaluó la expresión de los siguientes marcadores: Abcg2, Aldh1, Sox2, Nanog y Oct4.

El transportador **Abcg2** se ha relacionado con resistencia a TFD por expulsar la PpIX de la célula (Robey *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2015b) y, además, su sobreexpresión es considerada marcador de CMCs (Ding *et al.*, 2010). En este estudio, a nivel de ARNm, la expresión de Abcg2 en ASZ P era mayor que en P T, y en 10<sup>a</sup>G T mayor que en P T; en las resistentes de BSZ y CSZ era menor que en sus P y P T. Por tanto, aunque no hemos valorado su actividad, Abcg2 no parece estar relacionado con la resistencia a TFD en CBC. Estos resultados confirmarían la dependencia del tipo celular para este mecanismo descrita por Barron *et al.* (2013), quienes demostraron que la inhibición de ABCG2 incrementaba la eficacia de la TFD en la línea celular humana de queratinocitos HaCaT, de adenocarcinoma de esófago OE19 y de carcinoma de vejiga HT1197, pero no en la de neuroblastoma SH-SY5Y; y Palasuberniam *et al.* (2015) en distintas líneas de cáncer de mama. En cuanto a su papel como marcador de CMCs, estos datos indicarían que en CBC, como ocurre en otros tumores, dichas células no expresan o expresan bajos niveles de ABCG2 (Westover y Li, 2015). Además, estos resultados concuerdan con los descritos por Wee *et al.* (2016), que no encontraron relación entre la expresión de ABCG2, la formación de tumores y la resistencia a irradiación en células de glioma.

La activación transcripcional de **Aldh1**, se ha asociado con resistencia adquirida a drogas, entre otros motivos, por su actividad antioxidante (Tomita *et al.*, 2016). En este trabajo, se estudió la expresión de una de las variantes más comunes, la Aldh1a1 mediante RT-PCR, cuya expresión era baja en todas las líneas y disminuía en las 10<sup>a</sup>G y 10<sup>a</sup>G T respecto a sus P y P T. Cabe indicar que la correlación entre su expresión y fenotipos más agresivos o con peores pronósticos clínicos, depende del tejido y de la técnica empleada (Tomita *et al.*, 2016). En este sentido, en CBC, Ishida y Okabe (2013) y Erfani *et al.* (2016) observaron una baja expresión de la proteína en aproximadamente el 80 % de los casos evaluados, sin relación con la agresividad.

Finalmente, se analizaron otros 3 marcadores de CMCs, **Sox2**, **Nanog** y **Oct4**, todos ellos son factores de transcripción implicados en la regulación del desarrollo embrionario y la reprogramación celular. Su sobreexpresión, en general, se ha relacionado con tumorigenicidad, metástasis y resistencia a terapias, por reducir el estado de diferenciación de los tumores ([Hadjimichael et al., 2015](#); [Abbaszadegan et al., 2017](#)). En tumores epiteliales: Nanog se ha asociado a la sobreexpresión de reguladores de la TEM y a la progresión de papilomas a CEs ([Palla et al., 2015](#); [Jeter et al., 2015](#)); la expresión de Oct4 ha sido descrita en las células iniciadoras de diferentes tipos de tumores en un modelo murino *p53*<sup>-/-</sup> (similar al de BSZ y CSZ) que presentaban capacidades de CM aumentadas ([Darini et al., 2012](#); [Zeineddine et al., 2014](#)); y Sox2 aumenta la invasión, el volumen tumoral y la autorenovación de las CMCs en CE y melanoma ([Weina y Utikal, 2014](#)). Para ejercer su función, estos tres factores, necesitan cooperar ([Kashyap et al., 2009](#)).

En relación a la expresión de estos marcadores, [Yu y Yu \(2014\)](#) describieron el bloqueo de las propiedades de las CMCs (autorenovación, motilidad y quimioresistencia) en CE de cabeza y cuello tras TFD-ALA. Además, indicaron una reducción en la expresión de Oct4, Nanog, Abcg2 y Aldh1. Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran la disminución de la expresión de Abcg2 y Aldh1 en las poblaciones resistentes de las tres líneas celulares -exceptuando Abcg2 en ASZ-. Sin embargo, se han observado distintos patrones de expresión en Oct4, Sox2 y Nanog. Respecto a Oct4, tiende a aumentar su expresión en las poblaciones resistentes de las tres líneas. En cuanto a los otros dos marcadores, en la línea ASZ, se observó un aumento de expresión de Sox2 en 10<sup>a</sup>G y 10<sup>a</sup>G T. En este sentido, estudios con la línea ASZ, han descrito que la activación de Sox2 promueve iniciación y proliferación tumoral ([Eberl et al., 2012](#)). Por su parte, la expresión de Nanog disminuía en ASZ 10<sup>a</sup>G y 10<sup>a</sup>G T. Estas observaciones correlacionan con los estudios de [Araki et al. \(2015\)](#), quienes describieron la represión de Nanog por p53; por lo que la mayor expresión de p53 en ASZ 10<sup>a</sup>G T respecto a P T podría estar reprimiendo la expresión de este marcador. Por otra parte, en BSZ 10<sup>a</sup>G y 10<sup>a</sup>G T, se observó una disminución de la expresión de Sox2 respecto a P y P T. La disminución en la expresión de Sox2 ha sido asociada a supervivencia celular y metástasis en CE oral ([Villodre et al., 2016](#)). Por último, en CSZ 10<sup>a</sup>G y 10<sup>a</sup>G T aumentó la expresión de los tres marcadores, observándose, mediante IF, mayor expresión de Oct4 y Sox2 en las células fibroblastoides, apuntando, de nuevo, a un fenotipo más indiferenciado.

En resumen, Aldh1 y Abcg2 están reprimidas en las poblaciones resistentes, posiblemente por la TFD. Sin embargo, todas las resistentes mostraron mayor expresión de Oct4 y, al menos, de otro de los marcadores, Sox2 o Nanog. Dado que estos necesitan colaborar para mantener la pluripotencia, los datos deben ser analizados en conjunto, y

éstos indicarían un aumento de células con características de CMCs en todas las poblaciones resistentes.

Se ha observado que las CMCs presentan un fenotipo de células que han sufrido TEM. Se desconoce el mecanismo que vincula ambos fenotipos (CMCs y TEM), pero se sabe que hay diversas rutas comunes, como la de Wnt/ $\beta$ -cat (Li y Li, 2015; Wang *et al.*, 2015). Otros autores han descrito la inducción de TEM por la co-expresión de Oct4 y Nanog (observada en este estudio en BSZ y CSZ 10<sup>a</sup>G y 10<sup>a</sup>G T) en adenocarcinoma de pulmón (Chiou *et al.*, 2010), y la inducción de Oct4 por la sobreexpresión de  $\beta$ -cat en células de CE de cabeza y cuello (Lee *et al.*, 2014). Asimismo, Malanchi *et al.* (2008) aislaron una población de CMCs en CE, cuya localización de  $\beta$ -cat era preferentemente nuclear. Dada la relación de las CMCs con estos mecanismos, se valoraron proteínas implicadas en TEM y de la ruta Wnt/ $\beta$ -cat.

El proceso de **TEM** conlleva un cambio morfológico de epitelial/poligonal a fibroblastoide/ahusada, cambios fenotípicos -pérdida de adhesión célula-célula mediada por E-cad- e incremento de la expresión de marcadores mesenquimales como vimentina o N-cad; y se ve promovida, entre otros factores, por la activación de la ruta Wnt/ $\beta$ -cat (Hanahan y Weinberg, 2011; Nakamura y Tokura, 2011; Li y Li, 2015).

Como se ha señalado anteriormente, a **nivel morfológico**, la población 10<sup>a</sup>G de ASZ y BSZ, mostró un ligero alargamiento; y en CSZ 10<sup>a</sup>G se observó una población poligonal y una fibroblastoide. En las ASZ y CSZ 10<sup>a</sup>G T se apreciaron los mismos cambios morfológicos respecto a P T, que en la línea celular. Sin embargo, las BSZ 10<sup>a</sup>G T mostraron un cambio llamativo de morfología, presentando células espinosas (dendríticas). Como ya se ha señalado, estos cambios, indicarían una mayor agresividad.

Dados los cambios morfológicos observados, se valoró si estos estaban relacionados con la expresión de **marcadores mesenquimales**. Respecto a **vimentina**, hay evidencias que indican que la relación entre su expresión y la resistencia a terapias depende del tipo de tumor: en células de cáncer de ovario la resistencia a cisplatino se ha relacionado con una menor expresión de vimentina (Huo *et al.*, 2016), mientras que en células de carcinoma nasofaríngeo, se ha asociado con su aumento (Zhang *et al.*, 2014b). En este trabajo, no se apreciaron diferencias en su expresión entre las distintas poblaciones, por lo que no se pudo relacionar con la resistencia a TFD del CBC. Por su parte, la expresión de **N-cad**, solo se vio incrementada en las poblaciones resistentes de ASZ y en BSZ 10<sup>a</sup>G T respecto a P T. Sin embargo, disminuía en BSZ 10<sup>a</sup>G respecto a P. En CSZ no se observaron cambios significativos. Se ha descrito, una expresión aberrante de N-cad en fenotipos más fibroblastoides, invasivos, con mayor motilidad y con metástasis (Derycke y Bracke 2004; Di Domenico *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2016a),

correlacionando, con las morfologías observadas en algunas de las poblaciones resistentes (ASZ 10<sup>a</sup>G y 10<sup>a</sup>G T y BSZ 10<sup>a</sup>G T).

El indicador mejor estudiado de la TEM es la pérdida o disminución de expresión de **E-cad**. Este hecho fue observado en todas las poblaciones resistentes, a nivel de ARNm y de proteína, exceptuando en la línea ASZ. En estas células ni P ni 10<sup>a</sup>G mostraron expresión de E-cad, pero sí se apreció en la membrana y el citoplasma de las P T, lo que indicaría un cambio de fenotipo en ASZ P en el modelo *in vivo*. En CSZ 10<sup>a</sup>G y 10<sup>a</sup>G T sólo se apreció señal en las células poligonales, pero no en las fibroblastoides. En CBC, a nivel de tejido, la menor expresión de E-cad se ha relacionado con subtipos más agresivos (Pizarro, 1994; Papanikolaou *et al.*, 2010; Tucci *et al.*, 2013). De hecho, la pérdida de E-cad confiere una mayor capacidad de invasión, y puede deberse a mutaciones o a la expresión incrementada de cadherinas no epiteliales, entre otros (van Roy y Berx, 2008). La falta de aumento de N-cad en BSZ 10<sup>a</sup>G y CSZ 10<sup>a</sup>G y 10<sup>a</sup>G T, correlaciona con el estudio de Hashimoto *et al.* (2012), que relaciona la progresión del CE con la disminución de E-cad, pero no con la expresión de N-cad.

Como se ha indicado, la TEM es promovida por activación de la ruta **Wnt/β-cat**, por lo que, se estudió la expresión de dos elementos de la vía: β-cat total y su forma activa, la cual se ha visto asociada a una mayor proliferación en tejido de CBC; y la quinasa Gsk3β (Saldanha *et al.*, 2004; Saito-Diaz *et al.*, 2013; Lamouille *et al.*, 2014). La **β-cat** total se localizaba en todas las líneas a nivel de membrana y difusa en el citoplasma. En ASZ, no se encontraron cambios entre sus distintas poblaciones; excepto en ASZ P T, en la que se expresó, además, en el núcleo, y fue la única en la que se detectó la forma activa de la proteína, lo que indicaría una mayor adhesión de P T. En BSZ y CSZ 10<sup>a</sup>G y 10<sup>a</sup>G T disminuyó la β-cat total. En BSZ 10<sup>a</sup>G T tanto la total como la activa se localizaban, además, en el núcleo. En CSZ, se apreció una menor expresión de β-cat en las células fibroblastoides; y la forma activa se observó en la membrana de P y P T y en el núcleo de 10<sup>a</sup>G. Estos datos confirman la disminución de la adhesión en las poblaciones resistentes de BSZ y CSZ, y de ASZ a nivel de tumor. Las observaciones no coinciden con los descritos en la línea resistente de SCC-13, ya que no se observaron diferencias en el patrón de expresión de E-cad y β-cat (Milla *et al.*, 2011). No obstante, Casas *et al.* (2008 a y b), en células resistentes LM3, describieron la desregulación de los complejos E-cad/β-cat, pero no una disminución en su expresión.

En cuanto a la quinasa **Gsk3β**, se ha descrito que se encuentra disminuida en aquellas células que tienen la ruta constitutivamente activada, como ocurre en la mayoría de tumores sólidos (McCubrey *et al.*, 2014; Domoto *et al.*, 2016). Los resultados de este trabajo revelaron un aumento de expresión en las poblaciones resistentes de ASZ; mientras que ésta disminuía en las de BSZ y CSZ. Su localización fue difusa en el



citoplasma, con excepción de BSZ 10<sup>a</sup>G, que fue nuclear. La localización nuclear de Gsk3 $\beta$ , se ha correlacionado con: apoptosis (Meares y Jope, 2007), senescencia replicativa (Zmijewski y Jope, 2004) y con la fase S del ciclo celular (Diehl *et al.*, 1998). Además, asociada a la pérdida de  $\beta$ -cat en membrana se relaciona con un mal pronóstico en cáncer de colon (Salim *et al.*, 2013). En CSZ 10<sup>a</sup>G, las células fibroblastoides mostraron menor expresión que las poligonales. El papel de esta proteína en los procesos de resistencia no está bien definido. Así, se ha asociado el aumento de Gsk3 $\beta$  con resistencia a gemcitabina y radiación en células de cáncer de páncreas (Kitano *et al.*, 2013); mientras que, su inhibición se ha relacionado con el aumento de la resistencia a cisplatino en células de adenocarcinoma de pulmón (Gao *et al.*, 2013) y con autofagia, favoreciendo la supervivencia, en células de cáncer de páncreas (Marchand *et al.*, 2015).

Los resultados descritos en este apartado, junto con las evidencias que relacionan la ausencia de p53 con un aumento en la expresión de  $\beta$ -cat y de otros componentes de la ruta Wnt/ $\beta$ -cat que favorecen la TEM y el mantenimiento de propiedades de CM (Sadot *et al.*, 2001; Cagatay y Ozturk, 2002; Levina *et al.*, 2004; Prowald *et al.*, 2007; Araki *et al.*, 2015), permiten hipotetizar dos mecanismos de resistencia del CBC a TFD-MAL, dependientes de la expresión de p53. En ambos casos se presenta en las poblaciones resistentes un cambio de morfología hacia fenotipos fusiformes y un aumento de la población de CMCs (**Anexo 2**).

- En presencia de p53: (ASZ). La expresión de p53 aumenta en 10<sup>a</sup>G T respecto a P T, la cual favorece la menor expresión de  $\beta$ -cat, y aumenta la de Gsk3 $\beta$ , reprimiéndose la ruta Wnt/ $\beta$ -cat especialmente en las líneas resistentes. La adhesión de esta línea celular es baja. El proceso de TEM, en esta situación, iría asociada a un aumento de la expresión de N-cad en las líneas resistentes.

- En ausencia de p53: (BSZ y CSZ). En las poblaciones resistentes que carecen de p53, la expresión de Gsk3 $\beta$  disminuye y la de  $\beta$ -cat nuclear parece más evidente, lo que indica mayor actividad de la ruta Wnt/ $\beta$ -cat. El proceso de TEM en este caso, va asociado a una disminución de la adhesión (E-cad y  $\beta$ -cat en membrana); pero sin mayor expresión de proteínas mesenquimales, excepto en BSZ 10<sup>a</sup>G T, en la que se observa un aumento significativo de N-cad respecto a P T.

## 5.2. Evaluación de fibroblastos aislados de distintos tipos de CBC

Una vez confirmado, mediante observación histológica, el tipo de CBC de cada biopsia de paciente (superficial, nodular e invasivo), se valoró la expresión de diversos marcadores de carcinogénesis en tejido. A pesar de que el tamaño muestral es limitado, se apreciaron diferencias de expresión de todos los marcadores estudiados entre las muestras control y los CBCs. No se encontraron diferencias relevantes entre los distintos

tipos de CBCs, en el caso de **EGFR** y **PDPN**, que se expresaron en todos los CBCs sin diferencias entre los subtipos de tumor, correlacionando con estudios previos publicados por otros autores, que no encontraron diferencias en la expresión de EGFR entre los tipos de CBC (Yerebakan *et al.*, 2003; Janisson-Dargaud *et al.*, 2008), ni en la de PDPN entre piel control y CBCs (Wojciechowska-Zdrojowy *et al.* 2016).

Sin embargo, la expresión de **P53** parecía disminuir con la agresividad, observándose en CBCs superficiales y nodulares y solamente en uno de los CBCs invasivos (SL11), correlacionando con los estudios de Mercut *et al.* (2014), que indican que su expresión disminuye en los subtipos de CBC más agresivos. Asimismo se observó una aparente disminución de expresión de **SOX2** con la agresividad, correlacionando con estudios que indican que su pérdida está relacionada con un fenotipo invasivo y la resistencia a terapias en CE de cabeza y cuello (Bayo *et al.*, 2015), en cáncer de mama (Wu *et al.*, 2013) y gástrico (Chen *et al.*, 2016). En cuanto a la proteína  $\alpha$ -SMA sólo es considerada marcador de agresividad cuando es expresada en el estroma de CBCs, y ésta ha sido observada en los tipos más agresivos (Adegboyega *et al.* 2010; Mercut *et al.*, 2014), lo que apoya los resultados de este estudio, en el que se observó en el estroma sólo de forma parcial en un superficial y en todos los nodulares e invasivos -excepto en un invasivo (SL12)-.

En diversos tipos de cáncer, se ha demostrado la importancia de los **CAFs** en el proceso tumoral y su papel en la resistencia a terapias. Su caracterización es compleja, ya que su expresión de marcadores es heterogénea, debido a un origen diverso; por lo que deben considerarse varios de los mismos (Shiga *et al.*, 2015; Kalluri, 2016). Se realizó, por tanto, la evaluación de diversos marcadores de CAFs en los fibroblastos aislados a partir de CBCs (**Anexo 3**). Se debe tener en cuenta que, en comparación con los fibroblastos normales, los CAFs de CBC disminuyen la expresión de dichos marcadores *in vitro* (Lacina *et al.*, 2007).

En este estudio, la **Vinculina** se localizó en los contactos focales y, además, difusa en el citoplasma de los fibroblastos de CBC; mostrando en los nodulares una localización más definida en los contactos focales. En los fibroblastos de CBC la expresión era menor que en los controles, y menor en invasivos que en superficiales. Estas observaciones concuerdan con las de otros autores que asocian una menor expresión de Vinculina o un menor número de contactos focales, con una mayor migración y proliferación celular (Rodríguez-Fernández *et al.*, 1992 a y b; Hellevik *et al.*, 2012; Goldmann *et al.*, 2013; Goldmann, 2016).

La **Vimentina**, en contra de lo esperado, mostró una mayor expresión en los fibroblastos control que en los fibroblastos de CBCs nodulares e invasivos. Otros autores

no han observado diferencias en su expresión entre fibroblastos normales y CAFs de CE de lengua (Liu *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2014) ni de cáncer colorectal (Schellerer *et al.*, 2014).

La expresión de **FAP-1** se considera marcador de mal pronóstico en cánceres epiteliales (Teichgräber *et al.*, 2015), observándose en el estroma de todos los CBCs infiltrativos estudiados por Abbas *et al.* (2010). En este estudio, a nivel de ARNm no se apreciaron diferencias significativas entre los fibroblastos de los distintos tipos de CBC; sin embargo, a nivel de proteína, los CAFs de CBC presentaban menor expresión que los controles, siendo menor en nodulares que en invasivos. Estos resultados correlacionan con la elevada expresión de FAP-1 en fibroblastos sanos *in vitro*, simulando un estado de herida que no cierra (Zi *et al.*, 2015) y con las observaciones de Kilvaer *et al.* (2015), que indicaron que su expresión en CAFs es un marcador de buen pronóstico en cáncer de pulmón tipo CE. Kilvaer *et al.* (2015), además, demostraron que FAP-1 y  $\alpha$ -SMA marcan poblaciones diferentes de CAFs.

Es conocido que **Endoglin** se expresa en la membrana celular en etapas tempranas del proceso tumoral con un papel anticancerígeno y que desaparece de la misma en etapas más avanzadas (Pérez-Gómez *et al.*, 2007 y 2010; Quintanilla *et al.*, 2015) debido a la regulación de su transcripción o al corte proteolítico de la proteína por la MMP-14 (Liu *et al.*, 2014; del Castillo *et al.*, 2015). En este trabajo, los fibroblastos control presentaban mayor expresión que los fibroblastos de CBCs, y ésta era mayor en los de superficiales que en los de nodulares; lo que podría indicar que los nodulares serían los más agresivos de los fibroblastos de CBC.

Los resultados obtenidos de  **$\alpha$ -SMA** indican que su expresión era variable entre las distintas muestras, independientemente del tipo de CBC. Este marcador sólo caracteriza a la subpoblación de CAFs con fenotipo de miofibroblastos, lo que explica que en ocasiones, su expresión en fibroblastos sanos, sea equivalente a la de los CAFs (Berdie-Acer *et al.*, 2014; Öhlund *et al.*, 2014), e indicaría que sólo algunos de los fibroblastos de CBC tendrían dichas características. En CAFs de CE, se ha descrito se sobreexpresión (Liu *et al.*, 2006); mientras que en CBC, Lacina *et al.* (2007) sólo observaron algunos CAFs positivos para  $\alpha$ -SMA en pases bajos y ninguno en pases altos.

La proteína **S100A4** está relacionada con metástasis y se considera un inductor de TEM (Bresnick *et al.*, 2015). En este estudio no se han observado diferencias entre fibroblastos sanos y de CBC a nivel de ARNm. Esto coincide con los resultados de Boye y Maelandsmo (2010), quienes describieron su expresión en fibroblastos sanos, y Li *et al.* (2009) en la epidermis circundante de CBCs, indicando su disminución con la malignización. Por tanto, aunque S100A4 parece ser importante para la metástasis en otros tipos de cáncer, no lo sería en CBC. No obstante, en este estudio, aunque no se ha

observado relación entre su nivel de expresión y el tipo de CBC, sí se han observado diferencias en su localización que podrían tener relación con la invasividad: en fibroblastos control y de CBC superficial a modo de red tipo RE y, en los de CBCs nodulares e invasivos, también formaba fibras o estaba difusa en el citoplasma. Esta localización en fibras o difusa, fue también observada por [Jaiswal y Nylandsted \(2015\)](#) y relacionada con el papel de S100A4 en el mantenimiento del potencial invasor. Asimismo, la distribución en fibras y reticulada ha sido observada en la línea HVSMC de musculo liso ([Mandinova et al., 1998](#)), lo que podría indicar un fenotipo similar a miofibroblasto.

El incremento de expresión de **GAL-1** se ha correlacionado con numerosos procesos de progresión tumoral, incluida la TEM ([Chong et al., 2016](#); [Cousin y Cloninger, 2016](#)). En este estudio, no se observaron diferencias a nivel de ARNm; sin embargo, a nivel de proteína, se ha observado una menor expresión en fibroblastos de CBC nodular e invasivo respecto a controles y superficiales; por lo que su menor expresión se relaciona con tipos más agresivos.

Las **MMPs** están asociadas a la remodelación de la MEC y, en particular, con la invasión tumoral ([Taguchi et al., 2014](#); [Shay et al., 2015](#)). Los resultados obtenidos en este estudio mostraron expresión variable de **MMP-1** y de **MMP-9**, a nivel de ARNm, entre los distintos fibroblastos procedentes de CBC pero, al menos en la mitad de las muestras, su expresión era mayor a la de los controles. Los estudios realizados sobre expresión de MMPs en CBCs revelan, en general, una mayor expresión de ambas en el estroma tumoral respecto a la piel control ([Zlatarova et al., 2012](#)). Sin embargo, respecto a MMP-9 existen resultados variables. Mientras que los estudios de [Poswar et al. \(2013\)](#) indicaron que su expresión en el estroma no se correlaciona con el tipo de CBC, los de [Lupu et al. \(2016\)](#) sólo la detectaron en los fibroblastos de CBC invasivo. Asimismo, se ha descrito en pacientes con síndrome de Gorlin-Goltz (*PTCH+/-*), que los fibroblastos de áreas sin tumor eran similares a los CAFs de CBC, sobreexpresando MMP-1, entre otros factores ([Lupu et al., 2016](#)).

La reprogramación metabólica también ocurre en los CAFs, que adquieren un metabolismo más glicolítico, lo que activa la **producción de ROS**, promoviendo la TEM y la adquisición de propiedades de CM ([Li y Li, 2015](#)). Los resultados de este trabajo indicaron que la producción de ROS era variable en los CAFs de CBC, pero, en general, en los de superficial y nodular era mayor que en los fibroblastos control e invasivos.

Dada la producción de ROS observada en los CAFs, se procedió a continuación a realizar la evaluación de la expresión de un panel de genes relacionados con estrés oxidativo. Otros autores han descrito sobreexpresión de genes citoprotectores y detoxificantes tras la exposición a estrés oxidativo ([Traverso et al., 2013](#)), y que coinciden

con los de los fibroblastos de CBCs estudiados: *FTH1* (en nodulares e invasivos), *GCLM* (en nodulares e invasivos) y *HO-1* (en todos los CAFs). Sin embargo, se ha descrito la sobreexpresión de otros genes que en nuestro caso estaban subexpresados o no alterados de forma significativa: *GCLC* (subexpresada en todos los CAFs), *GSR* (no alterada) y *NQO1* (no alterada). De todos los genes alterados en los CAFs de este estudio, se seleccionaron *HO-1*, *UCP2* y *GSS* con el fin de confirmar los resultados anteriores.

La **HO-1** previene el daño al ADN en células sanas, pero su sobreexpresión favorece la progresión del cáncer, y cuando es inducida por terapias como la TFD, protege a las células de la apoptosis, favoreciendo su resistencia (Nowis *et al.*, 2006; Raval *et al.*, 2012; Dunn *et al.*, 2014; Chau, 2015). Estos estudios apoyarían los resultados de este trabajo en cuanto que todos los CAFs presentaron mayor expresión de HO-1 a nivel de ARNm, aunque a nivel de proteína, los datos no son tan concluyentes. Cabe destacar la elevada expresión de HO-1, superior a la del resto de fibroblastos, de una de las muestras de invasivos (SL15).

La sobreexpresión de **UCP2** se ha asociado con crecimiento tumoral, metástasis y quimioresistencia, pudiendo favorecer la supervivencia disminuyendo la generación de ROS (Mori *et al.*, 2008; Robbins y Zhao, 2011). La UCP2 es regulada por ROS: cuando los niveles de ROS mitocondriales son tolerables por la célula, UCP2 se conjuga con GSH, y se inactiva; pero con mayores niveles de ROS, UCP2 se separa de GSH, y desacopla la fosforilación oxidativa mitocondrial de la producción de ATP (Mailloux *et al.*, 2011). El análisis mediante *array* y RT-PCR muestra que UCP2 está subexpresada en los fibroblastos de todos los tipos de CBC. Sin embargo, a nivel de proteína, los de CBC superficial y nodular expresaron mayores niveles de UCP2 que controles e invasivos, lo que correlaciona con los mayores niveles de ROS observados en superficiales y nodulares.

Por último, se analizó la expresión de genes relacionados con el metabolismo del GSH, el cual es un fotoprotector en células de la piel sintetizado por la acción de GCL, la cual tiene dos subunidades (GCLC y GCLM), y **GSS** (Godic *et al.*, 2014). El estudio mediante *array* reveló subexpresión de GCLC en todos los CAFs y sobreexpresión de GCLM y de GSS en nodulares e invasivos, lo que apuntaría a una síntesis alterada de GSH. Sin embargo, a nivel de proteína, GSS se encontraba menos expresada en nodulares respecto a controles y superficiales. En general, un mayor nivel de GSH, de actividad de GCL y de transcripción del gen *GCLC* ha sido asociado con resistencia, mientras que no está claro en el caso de la GCLM (Lu, 2009; Traverso *et al.*, 2013). Sin embargo, en cáncer de pulmón de células no pequeñas una menor expresión de GCLC ha sido relacionada con la resistencia a erlotinib (Li *et al.*, 2016b), apoyando nuestros resultados. En cuanto a GSS, se ha observado su sobreexpresión en cáncer de colon



(Kim *et al.*, 2015a) y de hígado (Huang *et al.*, 2001). Sin embargo, en glioblastomas no se ha observado alteración ni de GSS, ni de GCLM (Panosyan *et al.*, 2017). En tumores cutáneos murinos GCLC, GCLM y GSS estaban sobreexpresados respecto a la piel sana y la síntesis de GSH estaba aumentada (Rolfs *et al.*, 2015).

Las diferencias observadas en la expresión de los diversos marcadores estudiados a nivel de ARNm y de proteína podrían tener su explicación en la traducción alterada de mensajeros debida a diversas situaciones como el estrés oxidativo, tal y como se ha descrito en numerosos estudios (Holcik y Sonenberg, 2005; Spriggs *et al.*, 2010; Ruggero, 2013).

### 5.3. Respuesta a TFD de la línea CSZ en co-cultivo indirecto

---

En este último apartado, se valoró la potencial implicación de los CAFs en la respuesta de células tumorales de CBC a TFD. Se emplearon las células CSZ, seleccionadas de acuerdo a la expresión de los marcadores estudiados que reflejaban una mayor resistencia de su 10<sup>a</sup>G; y medio de cultivo condicionado con los fibroblastos control SL01 (MC) y con los del CBC invasivo SL15 (MI) (**Tabla 10**) para la realización de los correspondientes co-cultivos. A nivel de **supervivencia celular** en ambas poblaciones, el MC parecía inducir una mayor resistencia a TFD; sin embargo, el MI disminuyó la proliferación de las células P, pero no ocasionó un efecto significativo sobre la respuesta a TFD. El papel inhibitorio de los fibroblastos sobre la proliferación se ha observado en la mayoría de fibroblastos sanos y en CAFs de algunos tipos de cáncer, como de mama (Flaberg *et al.*, 2011; Augsten, 2014) y de pulmón de células pequeñas (Takahashi *et al.*, 2015). Los estudios sobre el papel de los fibroblastos sobre la efectividad de la TFD en células neoplásicas son escasos. Glidden *et al.* (2012) observaron una mayor resistencia a TFD cuando células de adenocarcinoma ductal de páncreas eran co-cultivadas con fibroblastos normales durante 7 días en modelo 3D, mientras que Celli (2012) no observó efecto de los fibroblastos normales sobre la efectividad de la TFD en células de cáncer de páncreas. Asimismo, Chen *et al.* (2015) no apreciaron diferencias significativas empleando medio de cultivo condicionado de CAFs en cultivo 2D y 3D.

A continuación, se estudiaron diversos aspectos relacionados con los medios de cultivo condicionados que podrían estar involucrados en la respuesta a TFD.

En primer lugar, está ampliamente descrito que la presencia de FBS/proteína provoca una mayor expulsión de PpIX al medio extracelular por parte de Abcg2, lo que induce resistencia a TFD (Ogino *et al.*, 2011; Yamamoto *et al.*, 2013). Por tanto, la mayor **concentración de proteína** observada en el MC respecto al Control (DMEM), podría

favorecer la salida de PpIX, dependiente de Abcg2 (subexpresada en 10<sup>a</sup>G) favoreciendo su resistencia a TFD. En MI, no se encontraron diferencias significativas.

Por su parte, los resultados de la actividad de **MMP-2** y **MMP-9**, indicaron que la actividad total de ambas era mayor en el MI que en el MC, predominando la MMP-2 en ambos medios, mientras que MMP-9 mostró niveles algo menores en el MI. La falta de efecto del MI sobre la TFD, a pesar de la mayor actividad de MMPs observada, podría deberse a una disminución de su expresión en co-cultivo respecto al cultivo individual, como describieron [Chen et al. \(2006\)](#) para MMP-2 en co-cultivo indirecto de CAFs de CBC. O podría deberse a que la TFD haya inducido su subexpresión, como se ha descrito para: MMP-9 con Hipericina (cáncer nasofaríngeo) y Foscan (CE oral), y MMP-2 con Hexvix (meduloblastoma) y Foscan (CE oral), entre otros ([Sharwani et al., 2006](#); [Bhuvaneswari et al., 2009](#); [Milla et al., 2013](#); [Zhang et al., 2014a](#)). En CBC, la TFD-MAL podría estar inhibiendo las MMPs.

Por último, no se observaron diferencias en los patrones de expresión de las **proteínas de adhesión** E-cad y  $\beta$ -cat ni en P ni en 10<sup>a</sup>G tras su incubación con MC y MI; a diferencia de los estudios de [Xu et al. \(2014\)](#), en los que fibroblastos sanos inducían pérdida de E-cad en células de cáncer gástrico; y de [Zhou et al. \(2014\)](#), que observaron TEM en células de CE en co-cultivo con CAFs, y no con fibroblastos sanos.

#### 5.4. Limitaciones del estudio

---

A pesar de la relevancia de las conclusiones obtenidas de este estudio, se deben tener en cuenta ciertas limitaciones del mismo.

En primer lugar, la ausencia de líneas celulares establecidas de CBC humano y la dificultad en la obtención y mantenimiento de queratinocitos humanos en cultivo impiden desarrollar el análisis de los mecanismos de resistencia del CBC a TFD en células humanas.

En segundo lugar, el empleo de una muestra mayor de biopsias humanas en el segundo bloque de experimentos habría permitido obtener una mayor potencia estadística.

En tercer lugar, los fibroblastos control empleados en el estudio de los CAFs de CBC no pertenecen a los mismos pacientes de los que provienen las biopsias de tumores, por los inconvenientes derivados del trabajo con pacientes. Este hecho dificulta las comparaciones genéticas.



# Conclusiones

De los resultados obtenidos en el presente trabajo, se extraen las siguientes conclusiones:

1. La expresión diferencial de p53 de las líneas celulares de CBC murino ASZ, BSZ y CSZ se relaciona con su capacidad proliferativa y la eficiencia de plaqueo, siendo ASZ, la línea que expresa el gen, la que presentó menor capacidad proliferativa y mayor eficiencia de plaqueo.
2. La población de ASZ resistente a TFD-MAL no muestra cambios a nivel proliferativo respecto a su parental, por lo que no se considera un factor implicado en su resistencia. Sin embargo, las poblaciones resistentes de BSZ y CSZ disminuyen su capacidad proliferativa, lo que favorece su resistencia.
3. La resistencia del CBC a TFD-MAL depende de la localización y producción del fotosensibilizador PpIX: en las líneas ASZ y BSZ, la mayor sensibilidad a TFD de las parentales se ve favorecida por la localización nuclear de la PpIX; mientras que en CSZ, las parentales producen una mayor acumulación de PpIX respecto a su población resistente.
4. Las poblaciones resistentes de las líneas de CBC murino estudiadas presentan una mayor capacidad tumorigénica que sus parentales, generando tumores de mayor tamaño en el modelo *in vivo*.
5. Las cultivos de células resistentes de las líneas de CBC murino presentan una población mayor de CMCs que sus parentales, expresando niveles superiores de Oct4 y de Sox2 o Nanog. Las proteínas Aldh1 y la Abcg2 parecen estar inhibidas por la TFD-MAL.
6. La expresión de p53 condiciona las características adquiridas por las poblaciones resistentes. En presencia de p53, presentan inhibición de la ruta Wnt/ $\beta$ -cat por Gsk3 $\beta$  y mayor expresión de N-cad. En ausencia de p53, la ruta Wnt/ $\beta$ -cat se encuentra activada por disminución de Gsk3 $\beta$  y muestran una menor adhesión por subexpresión de E-cad y  $\beta$ -cat en membrana. Todas las poblaciones resistentes adquieren morfologías más fibroblastoides y disminuyen su tamaño.
7. Los fibroblastos aislados a partir de CBCs humanos presentan ciertas características de CAFs que los diferencian de los fibroblastos control. Muestran una menor expresión de Endogлина y Vinculina, y, en general, mayor expresión de  $\alpha$ -SMA, MMP-1 y MMP-9. La localización de S100A4 difusa o en fibras se asocia a una mayor agresividad (CAFs de CBC nodular e invasivo).

8. Los CAFs procedentes de los distintos tipos de CBC presentan alterada la expresión de numerosos genes relacionados con estrés oxidativo, especialmente de *HO-1*, *UCP2* y diversos genes de la síntesis de GSH.
9. El medio de cultivo condicionado con fibroblastos control promueve resistencia a TFD en CSZ P y 10<sup>a</sup>G. El medio condicionado con fibroblastos procedentes de un CBC invasivo inhibe la proliferación de las células CSZ P, pero no afecta a la resistencia a TFD ni en P ni en 10<sup>a</sup>G.
10. De acuerdo a lo anteriormente expuesto, la resistencia a TFD-MAL en CBC se relaciona con la localización/producción de PpIX, la mayor presencia de CMCs, la activación/represión de la ruta Wnt/ $\beta$ -cat y la adquisición de propiedades TEM - dependientes de p53-. Los CAFs no parecen condicionar la respuesta negativa a TFD en CBCs.





# Bibliografía

- Abbas O**, Richards JE, Mahalingam M. Fibroblast-activation protein: a single marker that confidently differentiates morpheaform/infiltrative basal cell carcinoma from desmoplastic trichoepithelioma. *Mod Pathol*. 2010. 23:1535-1543.
- Abbaszadegan MR**, Bagheri V, Razavi MS, Momtazi AA, Sahebkar A, Gholamin M. Isolation, identification, and characterization of cancer stem cells: A review. *J Cell Physiol*. 2017. 232:2008-2018.
- Abrahamse H**, Hamblin MR. New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochem J*. 2016. 473:347-364.
- Acedo P**, Zawacka-Pankau J. p53 family members - important messengers in cell death signaling in photodynamic therapy of cancer? *Photochem Photobiol Sci*. 2015. 14:1390-1396.
- Adegboyega PA**, Rodríguez S, McLarty J. Stromal expression of actin is a marker of aggressiveness in basal cell carcinoma. *Hum Pathol*. 2010. 41:1128-1137.
- Agathocleous M**, Harris WA. Metabolism in physiological cell proliferation and differentiation. *Trends Cell Biol*. 2013. 23:4844-4892.
- Agostinis P**, Berg K, Cengel KA, Foster TH, Girotti AW, Gollnick SO, Hahn SM, Hamblin MR, Juzeniene A, Kessel D, Korbelik M, Moan J, Mroz P, Nowis D, Piette J, Wilson BC, Golab J. Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA Cancer J Clin*. 2011. 61:250-281.
- Aguayo-Leiva IR**, Ríos-Buceta L, Jaén-Olasolo P. Surgical vs nonsurgical treatment of basal cell carcinoma. *Actas Dermosifiliogr*. 2010. 101:683-692.
- Al-Dimassi S**, Abou-Antoun T, El-Sibai M. Cancer cell resistance mechanisms: A mini review. *Clin Transl Oncol*. 2014. 16:511-516.
- Allison RR**, Moghissi K. Photodynamic Therapy (PDT): PDT mechanisms. *Clin Endosc*. 2013. 46:24-29.
- Amaral T**, Garbe C. Non-melanoma skin cancer: new and future synthetic drug treatments. *Expert Opin Pharmacother*. 2017. 18:689-699.
- Andersen K**, Mori H, Fata J, Bascom J, Oyjord T, Mælandsmo GM, Bissell M. The metastasis-promoting protein S100A4 regulates mammary branching morphogenesis. *Dev Biol*. 2011. 352:181-190.
- Apalla Z**, Nashan D, Weller RB, Castellsagué X. Skin Cancer: epidemiology, disease burden, pathophysiology, diagnosis, and therapeutic approaches. *Dermatol Ther*. 2017. 7:5-19.
- Araki K**, Ebata T, Guo AK, Tobiume K, Wolf SJ, Kawauchi K. p53 regulates cytoskeleton remodeling to suppress tumor progression. *Cell Mol Life Sci*. 2015. 72:4077-4094.
- Aszterbaum M**, Epstein J, Oro A, Douglas V, LeBoit PE, Scott MP, Epstein EH Jr. Ultraviolet and ionizing radiation enhance the growth of BCCs and trichoblastomas in patched heterozygous knockout mice. *Nat Med*. 1999. 5:1285-1291.
- Augsten M**. Cancer-associated fibroblasts as another polarized cell type of the tumor microenvironment. *Front Oncol*. 2014. 4:62 (8 pp).
- Bacellar IO**, Tsubone TM, Pavani C, Baptista MS. Photodynamic efficiency: from molecular photochemistry to cell death. *Int J Mol Sci*. 2015. 16:20523-20559.
- Ballatori N**, Krance SM, Notenboom S, Shi S, Tieu K, Hammond CL. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *Biol Chem*. 2009. 390:191-214.
- Barberi-Heyob M**, Védrine PO, Merlin JL, Millon R, Abecassis J, Poupon MF, Guillemin F. Wild-type p53 gene transfer into mutated p53 HT29 cells improves sensitivity to photodynamic therapy via induction of apoptosis. *Int J Oncol*. 2004. 24:951-958.
- Bardazzi F**, Loi C, Magnano M, Burtica EC, Giordano F, Patrizi A. Methyl-aminolevulinic acid photodynamic therapy for actinic keratoses: a useful treatment or a risk factor? A retrospective study. *J Dermatolog Treat*. 2015. 26:168-170.
- Barron GA**, Moseley H, Woods JA. Differential sensitivity in cell lines to photodynamic therapy in combination with ABCG2 inhibition. *J Photochem Photobiol B*. 2013. 126:87-96.

**Bayo P**, Jou A, Stenzinger A, Shao C, Gross M, Jensen A, Grabe N, Mende CH, Rados PV, Debus J, Weichert W, Plinkert PK, Lichter P, Freier K, Hess J. Loss of SOX2 expression induces cell motility via vimentin up-regulation and is an unfavorable risk factor for survival of head and neck squamous cell carcinoma. *Mol Oncol*. 2015. 9:1704-1719.

**Beck B**, Lehen'kyi V, Roudbaraki M, Flourakis M, Charveron M, Bordat P, Polakowska R, Prevarskaya N, Skryma R. TRPC channels determine human keratinocyte differentiation: new insight into basal cell carcinoma. *Cell Calcium*. 2008. 43:492-505.

**Benjamin CL**, Melnikova VO, Ananthaswamy HN. P53 protein and pathogenesis of melanoma and nonmelanoma skin cancer. *Adv Exp Med Biol*. 2008. 624:265-282.

**Berdiel-Acer M**, Sanz-Pamplona R, Calon A, Cuadras D, Berenguer A, Sanjuan X, Paules MJ, Salazar R, Moreno V, Batlle E, Villanueva A, Molleví DG. Differences between CAFs and their paired NCF from adjacent colonic mucosa reveal functional heterogeneity of CAFs, providing prognostic information. *Mol Oncol*. 2014. 8:1290-1305.

**Bhattacharya B**, Mohd Omar MF, Soong R. The Warburg effect and drug resistance. *Br J Pharmacol*. 2016. 173:970-979.

**Bhuvaneswari R**, Gan YY, Soo KC, Olivo M. The effect of photodynamic therapy on tumor angiogenesis. *Cell Mol Life Sci*. 2009. 66:2275-2283.

**Bieging KT**, Mello SS, Attardi LD. Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nat Rev Cancer*. 2014. 14:359-370.

**Boye K**, Maelandsmo GM. S100A4 and metastasis: a small actor playing many roles. *Am J Pathol*. 2010. 176:528-535.

**Braathén LR**, Morton CA, Basset-Seguín N, Bissonnette R, Gerritsen MJ, Gilaberte Y, Calzavara-Pinton P, Sidoroff A, Wulf HC, Szeimies RM. Photodynamic therapy for skin field cancerization: an international consensus. International Society for Photodynamic Therapy in Dermatology. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2012. 26:1063-1066.

**Breier G**, Grosser M, Rezaei M. Endothelial cadherins in cancer. *Cell Tissue Res*. 2014. 355:523-527.

**Bresnick AR**, Weber DJ, Zimmer DB. S100 proteins in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2015. 15:96-109.

**Broekgaarden M**, Weijer R, van Gulik TM, Hamblin MR, Heger M. Tumor cell survival pathways activated by photodynamic therapy: a molecular basis for pharmacological inhibition strategies. *Cancer Metastasis Rev*. 2015. 34:643-690.

**Cagatay T**, Ozturk M. P53 mutation as a source of aberrant beta-catenin accumulation in cancer cells. *Oncogene*. 2002. 21:7971-7980.

**Canel M**, Serrels A, Frame MC, Brunton VG. E-cadherin-integrin crosstalk in cancer invasion and metastasis. *J Cell Sci*. 2013. 126:393-401.

**Casas A**, Di Venosa G, Hasan T, Al Batlle. Mechanisms of resistance to photodynamic therapy. *Curr Med Chem*. 2011. 18:2486-2515.

**Casas A**, Di Venosa G, Vanzulli S, Perotti C, Mamome L, Rodríguez L, Simian M, Juarranz Á, Pontiggia O, Hasan T, Batlle A. Decreased metastatic phenotype in cells resistant to aminolevulinic acid-photodynamic therapy. *Cancer Lett*. 2008a. 271:342-351.

**Casas A**, Perotti C, Di Venosa G, Batlle A. Mechanisms of resistance to photodynamic therapy: an update. En: V. Rapozzi, G. Jori, ed. Springer. *Resistance to targeted anti-cancer therapeutics* Switzerland. 2015. 5:29-63.

**Casas A**, Perotti C, Ortel B, Di Venosa G, Saccoliti M, Batlle A, Hasan T. Tumor cell lines resistant to ALA-mediated photodynamic therapy and possible tools to target surviving cells. *Int J Oncol*. 2006. 29:397-405.

**Casas A**, Sanz-Rodríguez F, Di Venosa G, Rodríguez L, Mamome L, Blázquez A, Jaén P, Batlle A, Stockert JC, Juarranz Á. Disorganisation of cytoskeleton in cells resistant to photodynamic treatment with decreased metastatic phenotype. *Cancer Lett*. 2008b. 270:56-65.

**Celli JP**. Stromal interactions as regulators of tumor growth and therapeutic response: A potential target for photodynamic therapy? *Isr J Chem*. 2012. 52:757-766.

- Chan JS**, Tan MJ, Sng MK, Teo Z, Phua T, Choo CC, Li L, Zhu P, Tan NS. Cancer-associated fibroblasts enact field cancerization by promoting extratumoral oxidative stress. *Cell Death Dis.* 2017. 8:e2562 (12 pp).
- Chau LY**. Heme oxygenase-1: emerging target of cancer therapy. *J Biomed Sci.* 2015. 22:22 (7 pp).
- Chen GS**, Lu MP, Wu MT. Differential expression of matrix metalloproteinase-2 by fibroblasts in co-cultures with keratinocytes, basal cell carcinoma and melanoma. *J Dermatol.* 2006. 33:609-615.
- Chen Y**, Huang Y, Zhu L, Chen M, Huang Y, Zhang J, He S, Li A, Chen R, Zhou J. SOX2 inhibits metastasis in gastric cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2016. 142:1221-1230.
- Chen YC**, Lou X, Zhang Z, Ingram P, Yoon E. High-throughput cancer cell sphere formation for characterizing the efficacy of photodynamic therapy in 3D cell cultures. *Sci Rep.* 2015. 5:12175 (12 pp).
- Chiou SH**, Wang ML, Chou YT, Chen CJ, Hong CF, Hsieh WJ, Chang HT, Chen YS, Lin TW, Hsu HS, Wu CW. Coexpression of Oct4 and Nanog enhances malignancy in lung adenocarcinoma by inducing cancer stem cell-like properties and epithelial-mesenchymal transdifferentiation. *Cancer Res.* 2010. 70:10433-10444.
- Choi SY**, Sung R, Lee SJ, Lee TG, Kim N, Yoon SM, Lee EJ, Chae HB, Youn SJ, Park SM. Podoplanin,  $\alpha$ -smooth muscle actin or S100A4 expressing cancer-associated fibroblasts are associated with different prognosis in colorectal cancers. *J Korean Med Sci.* 2013. 28:1293-1301.
- Chong Y**, Tang D, Xiong Q, Jiang X, Xu C, Huang Y, Wang J, Zhou H, Shi Y, Wu X, Wang D. Galectin-1 from cancer-associated fibroblasts induces epithelial-mesenchymal transition through  $\beta$ 1 integrin-mediated upregulation of Gli1 in gastric cancer. *J Exp Clin Cancer Res.* 2016. 35:175 (13 pp).
- Choudhry Z**, Rikani AA, Choudhry AM, Tariq S, Zakaria F, Asghar MW, Sarfraz MK, Haider K, Shafiq AA, Mobassarh NJ. Sonic hedgehog signalling pathway: a complex network. *Ann Neurosci.* 2014. 21:28-31.
- Cirri P**, Chiarugi P. Cancer associated fibroblasts: the dark side of the coin. *Am J Cancer Res.* 2011. 1:482-497.
- Cojoc M**, Mäbert K, Muders MH, Dubrovskaya A. A role for cancer stem cells in therapy resistance: cellular and molecular mechanisms. *Semin Cancer Biol.* 2015. 31:16-27.
- Colak S**, Medema JP. Cancer stem cells--important players in tumor therapy resistance. *FEBS J.* 2014. 281:4779-4791.
- Cook JA**, Gius D, Wink DA, Krishna MC, Russo A, Mitchell JB. Oxidative stress, redox, and the tumor microenvironment. *Semin Radiat Oncol.* 2004. 14:259-266.
- Cousin JM**, Cloninger MJ. The role of Galectin-1 in cancer progression, and synthetic multivalent systems for the study of Galectin-1. *Int J Mol Sci.* 2016. 17:e1566 (22 pp).
- Crowson AN**. Basal cell carcinoma: biology, morphology and clinical implications. *Mod Pathol.* 2006. 19:127-147.
- Dąbrowski JM**, Arnaut LG. Photodynamic therapy (PDT) of cancer: from local to systemic treatment. *Photochem Photobiol Sci.* 2015. 14:1765-1780.
- Darini CY**, Pisani DF, Hofman P, Pedetour F, Sudaka I, Chomienne C, Dani C, Ladoux A. Self-renewal gene tracking to identify tumour-initiating cells associated with metastatic potential. *Oncogene.* 2012. 31:2438-2449.
- del Castillo G**, Sánchez-Blanco E, Martín-Villar E, Valbuena-Diez AC, Langa C, Pérez-Gómez E, Renart J, Bernabéu C, Quintanilla M. Soluble endoglin antagonizes Met signaling in spindle carcinoma cells. *Carcinogenesis.* 2015. 36:212-222.
- De Sousa E Melo F**, Vermeulen L, Fessler E, Medema JP. Cancer heterogeneity -a multifaceted view. *EMBO Rep.* 2013. 14:686-695.
- Derycke LD**, Bracke ME. N-cadherin in the spotlight of cell-cell adhesion, differentiation, embryogenesis, invasion and signalling. *Int J Dev Biol.* 2004. 48:463-476.

- Di Domenico M**, Pierantoni GM, Feola A, Esposito F, Laino L, DE Rosa A, Rullo R, Mazzotta M, Martano M, Sanguedolce F, Perillo L, D'Angelo L, Papagerakis S, Tortorella S, Bufo P, Lo Muzio L, Pannone G, Santoro A. Prognostic significance of N-Cadherin expression in oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res.* 2011. 31:4211-4218.
- Di Stefani A**, Chimenti S. Basal cell carcinoma: clinical and pathological features. *G Ital Dermatol Venereol.* 2015. 150:385-391.
- Diehl JA**, Cheng M, Roussel MF, Sherr CJ. Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev.* 1998. 12:3499-3511.
- Ding XW**, Wu JH, Jiang CP. ABCG2: a potential marker of stem cells and novel target in stem cell and cancer therapy. *Life Sci.* 2010. 86:631-637.
- Domoto T**, Pyko IV, Furuta T, Miyashita K, Uehara M, Shimasaki T, Nakada M, Minamoto T. Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  is a pivotal mediator of cancer invasion and resistance to therapy. *Cancer Sci.* 2016. 107:1363-1372.
- Dougherty TJ**, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbelik M, Moan J, Peng Q. Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst.* 1998. 90:889-905.
- Dunn LL**, Midwinter RG, Ni J, Hamid HA, Parish CR, Stocker R. New insights into intracellular locations and functions of heme oxygenase-1. *Antioxid Redox Signal.* 2014. 20:1723-1742.
- Dvořánková B**, Smetana K Jr, Říhová B, Kučera J, Mateu R, Szabo P. Cancer-associated fibroblasts are not formed from cancer cells by epithelial-to-mesenchymal transition in nu/nu mice. *Histochem Cell Biol.* 2015. 143:463-469.
- Dvořánková B**, Szabo P, Lacina L, Kodet O, Matoušková E, Smetana K Jr. Fibroblasts prepared from different types of malignant tumors stimulate expression of luminal marker keratin 8 in the EM-G3 breast cancer cell line. *Histochem Cell Biol.* 2012. 137:679-685.
- Eberl M**, Klingler S, Mangelberger D, Loipetzberger A, Damhofer H, Zoidl K, Schnidar H, Hache H, Bauer HC, Solca F, Hauser-Kronberger C, Ermilov AN, Verhaegen ME, Bichakjian CK, Dlugosz AA, Nietfeld W, Sibilia M, Lehrach H, Wierling C, Aberger F. Hedgehog-EGFR cooperation response genes determine the oncogenic phenotype of basal cell carcinoma and tumour-initiating pancreatic cancer cells. *EMBO Mol Med.* 2012. 4:218-233.
- Erfani E**, Roudi R, Rakhshan A, Sabet MN, Sharifabrizi A, Madjd Z. Comparative expression analysis of putative cancer stem cell markers CD44 and ALDH1A1 in various skin cancer subtypes. *Int J Biol Markers.* 2016. 31:53-61.
- Ericson MB**, Wennberg AM, Larko O. Review of photodynamic therapy in actinic keratosis and basal cell carcinoma. *Ther Clin Risk Manag.* 2008. 4:1-9.
- Esmatabadi MJ**, Bakhshinejad B, Motlagh FM, Babashah S, Sadeghizadeh M. Therapeutic resistance and cancer recurrence mechanisms: Unfolding the story of tumour coming back. *J Biosci.* 2016. 41:497-506.
- Fargnoli MC**, Peris K. Photodynamic therapy for basal cell carcinoma. *Future Oncol.* 2015. 11:2991-2996.
- Fiechter S**, Skaria A, Nievergelt H, Anex R, Borradori L, Parmentier L. Facial basal cell carcinomas recurring after photodynamic therapy: a retrospective analysis of histological subtypes. *Dermatology.* 2012. 224:346-351.
- Flaberg E**, Markasz L, Petranyi G, Stuber G, Dicso F, Alchihabi N, Oláh È, Csízy I, Józsa T, Andrén O, Johansson JE, Andersson SO, Klein G, Szekely L. High-throughput live-cell imaging reveals differential inhibition of tumor cell proliferation by human fibroblasts. *Int J Cancer.* 2011. 128:2793-2802.
- Frączek N**, Bronisz I, Pietryka M, Kępińska D, Strzała P, Mielnicka K, Korga A, Dudka J. An outline of main factors of drug resistance influencing cancer therapy. *J Chemother.* 2016. 28:457-464.
- Fu H**, Yang H, Zhang X, Xu W. The emerging roles of exosomes in tumor-stroma interaction. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2016. 142:1897-1907.
- Fuchs E**. Epithelial skin biology: three decades of developmental biology, a hundred questions answered and a thousand new ones to address. *Curr Top Dev Biol.* 2016. 116:357-374.



**Galadari S**, Rahman A, Pallichankandy S, Thayyullathil F. Reactive oxygen species and cancer paradox: To promote or to suppress? *Free Radic Biol Med*. 2017. 104:144-164.

**Gao Y**, Liu Z, Zhang X, He J, Pan Y, Hao F, Xie L, Li Q, Qiu X, Wang E. Inhibition of cytoplasmic GSK-3 $\beta$  increases cisplatin resistance through activation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in A549/DDP cells. *Cancer Lett*. 2013. 336:231-239.

**Giard DJ**, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst*. 1973. 51:1417-1423.

**Gilaberte Y**, Milla L, Salazar N, Vera-Alvarez J, Kourani O, Damian A, Rivarola V, Roca MJ, Espada J, González S, Juarranz Á. Cellular intrinsic factors involved in the resistance of squamous cell carcinoma to photodynamic therapy. *J Invest Dermatol*. 2014. 34:2428-2437.

**Gilaberte Y**, Prieto-Torres L, Pastushenko L, Juarranz Á. Anatomy and function of the skin. En: MR. Hamblin, P. Avci, TW. Prow, ed. Elsevier. *Nanoscience in Dermatology*. Netherlands. 2016. 12:1-12. ISBN: 9780128029268.

**Gilaberte Y**, Robres MP, Frías MP, García-Doval I, Rezusta A, Aspiroz C. Methyl aminolevulinate photodynamic therapy for onychomycosis: a multicentre, randomized, controlled clinical trial. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2017. 31:347-354.

**Glidden MD**, Massodi I, Rizvi I, Celli JP, Hasan T. Probing tumor-stroma interactions and response to photodynamic therapy in a 3D pancreatic cancer-fibroblast co-culture model. *Proceedings of SPIE*. 2012. 8210:1-8.

**Godic A**, Poljšak B, Adamic M, Dahmane R. The role of antioxidants in skin cancer prevention and treatment. *Oxid Med Cell Longev*. 2014. 2014:860479 (6 pp).

**Goldmann WH**, Auernheimer V, Thievessen I, Fabry B. Vinculin, cell mechanics and tumour cell invasion. *Cell Biol Int*. 2013. 37:397-405.

**Goldmann WH**. Role of vinculin in cellular mechanotransduction. *Cell Biol Int*. 2016. 40:241-256.

**Gonda TA**, Varro A, Wang TC, Tycko B. Molecular biology of cancer-associated fibroblasts: can these cells be targeted in anti-cancer therapy? *Semin Cell Dev Biol*. 2010. 21:2-10.

**Gordon R**. Skin cancer: an overview of epidemiology and risk factors. *Semin Oncol Nurs*. 2013. 29:160-169.

**Gottlöber P**, Krähn G, Bezold G, Peter RU. Basal cell carcinomas occurring after accidental exposure to ionizing radiation. *Br J Dermatol*. 1999. 141:383-385.

**Gracia-Cazaña T**, Salazar N, Zamarrón A, Mascaraque M, Lucena SR, Juarranz Á. Resistance of nonmelanoma skin cancer to nonsurgical treatments. Part II: photodynamic therapy, vismodegib, cetuximab, intralesional methotrexate, and radiotherapy. *Actas Dermosifiliogr*. 2016. 107:740-750.

**Grazzini M**, De Giorgi V. Squamous cell carcinoma. En: AD. Katsambas, TM Lotti, C. Dessinioti, AM. D'Erme, ed. Springer. *European handbook of dermatological treatments*. Germany. 2015. 31:921-929. ISBN: 978-3-662-45139-7.

**Griffin LL**, Lear JT. Photodynamic therapy and non-melanoma skin cancer. *Cancers*. 2016. 8:e98 (13 pp).

**Guarino M**. Epithelial-mesenchymal transition and tumour invasion. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007. 39:2153-2160.

**Hadjimichael C**, Chanoumidou K, Papadopoulou N, Arampatzi P, Papamatheakis J, Kretsovali A. Common stemness regulators of embryonic and cancer stem cells. *World J Stem Cells*. 2015. 7:1150-1184.

**Hanahan D**, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011. 144:646-674.

**Haque T**, Rahman KM, Thurston DE, Hadgraft J, Lane ME. Topical therapies for skin cancer and actinic keratosis. *Eur J Pharm Sci*. 2015. 77:279-289.

**Hashimoto T**, Soeno Y, Maeda G, Taya Y, Aoba T, Nasu M, Kawashiri S, Imai K. Progression of oral squamous cell carcinoma accompanied with reduced E-cadherin expression but not cadherin switch. *PLoS One*. 2012. 7:e47899 (8 pp).

**Hellevik T**, Pettersen I, Berg V, Winberg JO, Moe BT, Bartnes K, Paulssen RH, Busund LT, Bremnes R, Chalmers A, Martinez-Zubiaurre I. Cancer-associated fibroblasts from human NSCLC survive ablative doses of radiation but their invasive capacity is reduced. *Radiat Oncol*. 2012. 7:59 (13 pp).

**Hempel SL**, Buettner GR, O'Malley YQ, Wessels DA, Flaherty DM. Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123. *Free Radic Biol Med*. 1999. 27:146-159.

**Holcik M**, Sonenberg N. Translational control in stress and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005. 6:318-327.

**Holohan C**, van Schaeybroeck S, Longley DB, Johnston PG. Cancer drug resistance: An evolving paradigm. *Nat Rev Cancer*. 2013. 13:714-726.

**Housman G**, Byler S, Heerboth S, Lapinska K, Longacre M, Snyder N, Sarkar S. Drug resistance in cancer: an overview. *Cancers*. 2014. 6:1769-1792.

**Huang ZZ**, Chen C, Zeng Z, Yang H, Oh J, Chen L, Lu SC. Mechanism and significance of increased glutathione level in human hepatocellular carcinoma and liver regeneration. *FASEB J*. 2001. 15:19-21.

**Huo Y**, Zheng Z, Chen Y, Wang Q, Zhang Z, Deng H. Downregulation of vimentin expression increased drug resistance in ovarian cancer cells. *Oncotarget*. 2016. 7:45876-45888.

**Ishida M**, Okabe H. Aldehyde dehydrogenase 1 expression in basal cell carcinoma, actinic keratosis and Bowen's disease. *Mol Clin Oncol*. 2013. 1:621-624.

**Ishii G**, Ochiai A, Neri S. Phenotypic and functional heterogeneity of cancer-associated fibroblast within the tumor microenvironment. *Adv Drug Deliv Rev*. 2016. 99:186-196.

**Ishikawa T**, Nakagawa H, Hagiya Y, Nonoguchi N, Miyatake S, Kuroiwa T. Key role of human ABC transporter ABCG2 in photodynamic therapy and photodynamic diagnosis. *Adv Pharmacol Sci*. 2010. 2010:1-13.

**Jaiswal JK**, Nylandsted J. S100 and annexin proteins identify cell membrane damage as the Achilles heel of metastatic cancer cells. *Cell Cycle*. 2015. 14:502-509.

**Jaju PD**, Ransohoff KJ, Tang JY, Sarin KY. Familial skin cancer syndromes: Increased risk of nonmelanotic skin cancers and extracutaneous tumors. *J Am Acad Dermatol*. 2016. 74:437-451.

**Janisson-Dargaud D**, Durlach A, Lorenzato M, Grange F, Bernard P, Birembaut P. Aneuploidy, but not Ki-67 or EGFR expression, is associated with recurrences in basal cell carcinoma. *J Cutan Pathol*. 2008. 35:916-921.

**Jeanes A**, Gottardi CJ, Yap AS. Cadherins and cancer: how does cadherin dysfunction promote tumor progression? *Oncogene*. 2008. 27:6920-6929.

**Jeter CR**, Yang T, Wang J, Chao HP, Tang DG. Concise Review: NANOG in cancer stem cells and tumor development: An update and outstanding questions. *Stem Cells*. 2015. 33:2381-2390.

**Ji Z**, Yang G, Vasovic V, Cunderlikova B, Suo Z, Nesland JM, Peng Q. Subcellular localization pattern of protoporphyrin IX is an important determinant for its photodynamic efficiency of human carcinoma and normal cell lines. *J Photochem Photobiol B*. 2006. 84:213-220.

**Juarranz Á**, Jaén P, Sanz-Rodríguez F, Cuevas J, González S. Photodynamic therapy of cancer. Basic principles and applications. *Clin Transl Oncol*. 2008. 10:148-154.

**Kalluri R**, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006. 6:392-401.

**Kalluri R**. The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2016. 16:582-598.

**Kan S**, Konishi E, Arita T, Ikemoto C, Takenaka H, Yanagisawa A, Katoh N, Asai J. Podoplanin expression in cancer-associated fibroblasts predicts aggressive behavior in melanoma. *J Cutan Pathol*. 2014. 41:561-567.

**Kashyap V**, Rezende NC, Scotland KB, Shaffer SM, Persson JL, Gudas LJ, Mongan NP. Regulation of stem cell pluripotency and differentiation involves a mutual regulatory circuit of the NANOG, OCT4, and SOX2 pluripotency transcription factors with polycomb repressive complexes and stem cell microRNAs. *Stem Cells Dev.* 2009. 18:1093-1108.

**Kennedy JC**, Pottier RH, Pross DC. Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX: basic principles and present clinical experience. *J Photochem Photobiol B.* 1990. 6:143-148.

**Kharaishvili G**, Simkova D, Bouchalova K, Gachechiladze M, Narsia N, Bouchal J. The role of cancer-associated fibroblasts, solid stress and other microenvironmental factors in tumor progression and therapy resistance. *Cancer Cell Int.* 2014. 14:14-41.

**Kilvaer TK**, Khanehenkari MR, Hellevik T, Al-Saad S, Paulsen EE, Bremnes RM, Busund LT, Donnem T, Martinez IZ. Cancer associated fibroblasts in stage I-IIIa NSCLC: Prognostic impact and their correlations with tumor molecular markers. *PLoS One.* 2015. 10:e0134965 (15 pp).

**Kim AD**, Zhang R, Han X, Kang KA, Piao MJ, Maeng YH, Chang WY, Hyun JW. Involvement of glutathione and glutathione metabolizing enzymes in human colorectal cancer cell lines and tissues. *Mol Med Rep.* 2015a. 12:4314-4319.

**Kim JH**, Park JM, Roh YJ, Kim IW, Hasan T, Choi MG. Enhanced efficacy of photodynamic therapy by inhibiting ABCG2 in colon cancers. *BMC Cancer.* 2015b. 15:504 (9 pp).

**Kimáková P**, Solár P, Fecková B, Sačková V, Solárová Z, Ilkovičová L, Kello M. Photoactivated hypericin increases the expression of SOD-2 and makes MCF-7 cells resistant to photodynamic therapy. *Biomed Pharmacother.* 2017. 85:749-755.

**Kitano A**, Shimasaki T, Chikano Y, Nakada M, Hirose M, Higashi T, Ishigaki Y, Endo Y, Takino T, Sato H, Sai Y, Miyamoto K, Motoo Y, Kawakami K, Minamoto T. Aberrant glycogen synthase kinase 3 $\beta$  is involved in pancreatic cancer cell invasion and resistance to therapy. *PLoS One.* 2013. 8:e55289 (12 pp).

**Klein G**. Evolutionary aspects of cancer resistance. *Semin Cancer Biol.* 2014. 25:10-14.

**Kobuchi H**, Moriya K, Ogino T, Fujita H, Inoue K, Shuin T, Yasuda T, Utsumi K, Utsumi T. Mitochondrial localization of ABC transporter ABCG2 and its function in 5-aminolevulinic acid-mediated protoporphyrin IX accumulation. *PLoS One.* 2012. 7:e50082 (14 pp).

**Kopczyńska E**, Makarewicz R. Endoglin - a marker of vascular endothelial cell proliferation in cancer. *Contemp Oncol.* 2012. 16:68-71.

**Kozioł A**, Martín-Alonso M, Clemente C, Gonzalo P, Arroyo AG. Site-specific cellular functions of MT1-MMP. *Eur J Cell Biol.* 2012. 91:889-895.

**Kruiswijk F**, Labuschagne CF, Vousden KH. p53 in survival, death and metabolic health: a lifeguard with a licence to kill. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2015. 16:393-405.

**Lacina L**, Smetana K Jr, Dvoránková B, Pytlík R, Kideryová L, Kucerová L, Plzáková Z, Stork J, Gabius HJ, André S. Stromal fibroblasts from basal cell carcinoma affect phenotype of normal keratinocytes. *Br J Dermatol.* 2007. 156:819-829.

**Lamouille S**, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014. 15:178-196.

**Lange C**, Bednarski PJ. Photosensitizers for photodynamic therapy: photochemistry in the service of oncology. *Curr Pharm Des.* 2016. 22:6956-6974.

**Lanoue J**, Goldenberg G. Basal cell carcinoma: a comprehensive review of existing and emerging nonsurgical therapies. *J Clin Aesthet Dermatol.* 2016. 9:26-36.

**Lee JM**, Dedhar S, Kalluri R, Thompson EW. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J Cell Biol.* 2006. 172:973-981.

**Lee PK**, Kloser A. Current methods for photodynamic therapy in the US: comparison of MAL/PDT and ALA/PDT. *J Drugs Dermatol.* 2013. 12:925-930.

**Lee SH**, Koo BS, Kim JM, Huang S, Rho YS, Bae WJ, Kang HJ, Kim YS, Moon JH, Lim YC. Wnt/ $\beta$ -catenin signalling maintains self-renewal and tumorigenicity of head and neck squamous cell carcinoma stem-like cells by activating Oct4. *J Pathol.* 2014. 234:99-107.

- Levina E**, Oren M, Ben-Ze'ev A. Downregulation of beta-catenin by p53 involves changes in the rate of beta-catenin phosphorylation and Axin dynamics. *Oncogene*. 2004. 23:4444-4453.
- Li B**, Shi H, Wang F, Hong D, Lv W, Xie X, Cheng X. Expression of E-, P- and N-Cadherin and its clinical significance in cervical squamous cell carcinoma and precancerous lesions. *PLoS One*. 2016a. 11:e0155910 (13 pp).
- Li C**, Athar M. Ionizing radiation exposure and basal cell carcinoma pathogenesis. *Radiat Res*. 2016. 185:217-228.
- Li H**, Stokes W, Chater E, Roy R, de Bruin E, Hu Y, Liu Z, Smit EF, Heynen GJ, Downward J, Seckl MJ, Wang Y, Tang H, Pardo OE. Decreased glutathione biosynthesis contributes to EGFR T790M-driven erlotinib resistance in non-small cell lung cancer. *Cell Discov*. 2016b. 2:16031 (14 pp).
- Li H**, Zhang J, Chen SW, Liu LL, Li L, Gao F, Zhuang SM, Wang LP, Li Y, Song M. Cancer-associated fibroblasts provide a suitable microenvironment for tumor development and progression in oral tongue squamous cancer. *J Transl Med*. 2015. 13:198 (10 pp).
- Li L**, Li W. Epithelial-mesenchymal transition in human cancer: comprehensive reprogramming of metabolism, epigenetics, and differentiation. *Pharmacol Ther*. 2015. 150:33-46.
- Li Y**, Liu ZL, Zhang KL, Chen XY, Kong QY, Wu ML, Sun Y, Liu J, Li H. Methylation-associated silencing of S100A4 expression in human epidermal cancers. *Exp Dermatol*. 2009. 18:842-848.
- Liu K**, Lin B, Zhao M, Yang X, Chen M, Gao A, Liu F, Que J, Lan X. The multiple roles for Sox2 in stem cell maintenance and tumorigenesis. *Cell Signal*. 2013. 25:1264-1271.
- Liu Y**, Hu T, Shen J, Li SF, Lin JW, Zheng XH, Gao QH, Zhou HM. Separation, cultivation and biological characteristics of oral carcinoma-associated fibroblasts. *Oral Dis*. 2006. 12:375-380.
- Liu Z**, Lebrin F, Maring JA, van den Driesche S, van der Brink S, van Dinther M, Thorikay M, Martin S, Kobayashi K, Hawinkels LJ, van Meeteren LA, Pardali E, Korving J, Letarte M, Arthur HM, Theuer C, Goumans MJ, Mummery C, ten Dijke P. ENDOGLIN is dispensable for vasculogenesis, but required for vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis. *PLoS One*. 2014. 9:e86273 (12 pp).
- Lomas A**, Leonardi-Bee J, Bath-Hextall F. A systematic review of worldwide incidence of non-melanoma skin cancer. *Br J Dermatol*. 2012. 166:1069-1080.
- Lu SC**. Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med*. 2009. 30:42-59.
- Lu SC**. Glutathione synthesis. *Biochim Biophys Acta*. 2013. 1830:3143-3153.
- Lucena SR**, Salazar N, Gracia-Cazaña T, Zamarrón A, González S, Juarranz Á, Gilaberte Y. Combined treatments with photodynamic therapy for non-melanoma skin cancer. *Int J Mol Sci*. 2015. 16:25912-25933.
- Luna MC**, Gomer CJ. Isolation and characterization of mouse tumor cells resistant to porphyrin-mediated photodynamic therapy. *Cancer Res*. 1991. 51:4243-4249.
- Lupu M**, Caruntu C, Ghita MA, Voiculescu V, Voiculescu S, Rosca AE, Caruntu A, Moraru L, Popa IM, Calenic B, Greabu M, Costea DE. Gene expression and proteome analysis as sources of biomarkers in basal cell carcinoma. *Dis Markers*. 2016. 2016:9831237 (9 pp).
- Mailloux RJ**, Seifert EL, Bouillaud F, Aguer C, Collins S, Harper ME. Glutathionylation acts as a control switch for uncoupling proteins UCP2 and UCP3. *J Biol Chem*. 2011. 286:21865-21875.
- Malanchi I**, Peinado H, Kassen D, Hussenet T, Metzger D, Chambon P, Huber M, Hohl D, Cano A, Birchmeier W, Huelsken J. Cutaneous cancer stem cell maintenance is dependent on beta-catenin signalling. *Nature*. 2008. 452:650-653.
- Mandinova A**, Atar D, Schäfer BW, Spiess M, Aebi U, Heizmann CW. Distinct subcellular localization of calcium binding S100 proteins in human smooth muscle cells and their relocation in response to rises in intracellular calcium. *J Cell Sci*. 1998. 111:2043-2054.
- Marchand B**, Arsenault D, Raymond-Fleury A, Boisvert FM, Boucher MJ. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3) inhibition induces prosurvival autophagic signals in human pancreatic cancer cells. *J Biol Chem*. 2015. 290:5592-5605.

**Martinez-Outschoorn UE**, Goldberg A, Lin Z, Ko YH, Flomenberg N, Wang C, Pavlides S, Pestell RG, Howell A, Sotgia F, Lisanti MP. Anti-estrogen resistance in breast cancer is induced by the tumor microenvironment and can be overcome by inhibiting mitochondrial function in epithelial cancer cells. *Cancer Biol Ther*. 2011. 12:924-938.

**Marzuka AG**, Book SE. Basal cell carcinoma: pathogenesis, epidemiology, clinical features, diagnosis, histopathology, and management. *Yale J Biol Med*. 2015. 88:167-179.

**McCubrey JA**, Rakus D, Gizak A, Steelman LS, Abrams SL, Lertpiriyapong K, Fitzgerald TL, Yang LV, Montalto G, Cervello M, Libra M, Nicoletti F, Scalisi A, Torino F, Fenga C, Neri LM, Marmioli S, Cocco L, Martelli AM. Effects of mutations in Wnt/ $\beta$ -catenin, hedgehog, Notch and PI3K pathways on GSK-3 activity. Diverse effects on cell growth, metabolism and cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2016. 1863:2942-2976.

**McCubrey JA**, Steelman LS, Bertrand FE, Davis NM, Sokolosky M, Abrams SL, Montalto G, D'Assoro AB, Libra M, Nicoletti F, Maestro R, Basecke J, Rakus D, Gizak A, Demidenko ZN, Cocco L, Martelli AM, Cervello M. GSK-3 as potential target for therapeutic intervention in cancer. *Oncotarget*. 2014. 5:2881-2911.

**McDermott M**, Eustace AJ, Busschots S, Breen L, Crown J, Clynes M, O'Donovan N, Stordal B. In vitro development of chemotherapy and targeted therapy drug-resistant cancer cell lines: a practical guide with case studies. *Front Oncol*. 2014. 4:40 (16 pp).

**Meares GP**, Joep RS. Resolution of the nuclear localization mechanism of glycogen synthase kinase-3: functional effects in apoptosis. *J Biol Chem*. 2007. 282:16989-17001.

**Mercut R**, Ciurea ME, Mărgăritescu C, Popescu SM, Crăitoiu MM, Cotoi OS, Voinescu DC. Expression of p53, D2-40 and  $\alpha$ -smooth muscle actin in different histological subtypes of facial basal cell carcinoma. *Rom J Morphol Embryol*. 2014. 55:263-272.

**Meyer T**. Molecular pathogenesis of basal cell carcinoma. *Cancer Treat Res*. 2009. 146:193-204.

**Micali G**, Lacarrubba F, Bhatt K, Nasca MR. Medical approaches to non-melanoma skin cancer. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2013. 13:1409-1421.

**Micke P**, Kappert K, Ohshima M, Sundquist C, Scheidl S, Lindahl P, Heldin CH, Botling J, Ponten F, Ostman A. In situ identification of genes regulated specifically in fibroblasts of human basal cell carcinoma. *J Invest Dermatol*. 2007. 127:1516-1523.

**Mijušković, ZP**. Etiology and pathogenesis of basal cell carcinoma. *Serbian Journal of Dermatology and Venereology*. 2013. 5:113-124.

**Mikešová L**, Mikeš J, Kovač J, Gyurászová K, Culka L, Vargová J, Valeková B, Fedoročko P. Conjunction of glutathione level, NAD(P)H/FAD redox status and hypericin content as a potential factor affecting colon cancer cell resistance to photodynamic therapy with hypericin. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2013. 10:470-483.

**Milla L**, Rodríguez ME, Cogno IS, Rumie NB, Pansa MF, Lamberti MJ, Rivarola VA. Direct and indirect photodynamic therapy effects on the cellular and molecular components of the tumor microenvironment. *Biochim Biophys Acta*. 2013. 1835:36-45.

**Milla LN**, Cogno IS, Rodríguez ME, Sanz-Rodríguez F, Zamarrón A, Gilaberte Y, Carrasco E, Rivarola VA, Juarranz Á. Isolation and characterization of squamous carcinoma cells resistant to photodynamic therapy. *J Cell Biochem*. 2011. 112:2266-2278.

**Moan J**, Grigalavicius M, Baturaite Z, Dahlback A, Juzeniene A. The relationship between UV exposure and incidence of skin cancer. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2015. 31:26-35.

**Moitra K**, Lou H, Dean M. Multidrug efflux pumps and cancer stem cells: insights into multidrug resistance and therapeutic development. *Clin Pharmacol Ther*. 2011. 89:491-502.

**Mori S**, Yoshizuka N, Takizawa M, Takema Y, Murase T, Tokimitsu I, Saito M. Expression of uncoupling proteins in human skin and skin-derived cells. *J Invest Dermatol*. 2008. 128:1894-900.

**Morton CA**, Brown SB, Collins S, Ibbotson S, et al. Guidelines for topical photodynamic therapy: report of a workshop of the British Photodermatology Group. *Br J Dermatol*. 2002. 146:552-567.

**Mosmann T**. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983. 65:55-63.



- Nakamura M**, Tokura Y. Epithelial-mesenchymal transition in the skin. *J Dermatol Sci*. 2011. 61:7-13.
- Nantajit D**, Lin D, Li JJ. The network of epithelial-mesenchymal transition: potential new targets for tumor resistance. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2015. 141:1697-1713.
- Neville JA**, Welch E, Leffell DJ. Management of nonmelanoma skin cancer in 2007. *Nat Clin Pract Oncol*. 2007. 4:462-469.
- Nonell S**, Agut M, Semino C, Mora M, Sagristá ML, Cañete M, Stockert JC, Villanueva Á. Fundamentos físico-químicos de la Terapia Fotodinámica. En: Y. Gilaberte, ed. Aula Médica. *Terapia Fotodinámica en Dermatología*. España. 2015. 1:3-10. ISBN: 978-84-7885-5834.
- Nowis D**, Legat M, Grzela T, Niderla J, Wilczek E, Wilczynski GM, Głodkowska E, Mrówka P, Issat T, Dulak J, Józkowicz A, Waś H, Adamek M, Wrzosek A, Nazarewski S, Makowski M, Stokłosa T, Jakóbisiak M, Gołab J. Heme oxygenase-1 protects tumor cells against photodynamic therapy-mediated cytotoxicity. *Oncogene*. 2006. 25:3365-3374.
- Ogino T**, Kobuchi H, Munetomo K, Fujita H, Yamamoto M, Utsumi T, Inoue K, Shuin T, Sasaki J, Inoue M, Utsumi K. Serum-dependent export of protoporphyrin IX by ATP-binding cassette transporter G2 in T24 cells. *Mol Cell Biochem*. 2011. 358:297-307.
- Öhlund D**, Elyada E, Tuveson D. Fibroblast heterogeneity in the cancer wound. *J Exp Med*. 2014. 211:1503-1523.
- Olsen CE**, Berg K, Selbo PK, Weyergang A. Circumvention of resistance to photodynamic therapy in doxorubicin-resistant sarcoma by photochemical internalization of gelonin. *Free Radic Biol Med*. 2013. 65:1300-1309.
- Oniszcuk A**, Wojtunik-Kulesza KA, Oniszcuk T, Kasprzak K. The potential of photodynamic therapy (PDT)-Experimental investigations and clinical use. *Biomed Pharmacother*. 2016. 83:912-929.
- Ortel B**, Chen N, Brissette J, Dotto GP, Maytin E, Hasan T. Differentiation-specific increase in ALA-induced protoporphyrin IX accumulation in primary mouse keratinocytes. *Br J Cancer*. 1998. 77:1744-1751.
- Palasuberniam P**, Yang X, Kraus D, Jones P, Myers KA, Chen B. ABCG2 transporter inhibitor restores the sensitivity of triple negative breast cancer cells to aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy. *Sci Rep*. 2015. 5:13298 (12 pp).
- Palla AR**, Piazzolla D, Alcazar N, Cañamero M, Graña O, Gómez-López G, Dominguez O, Dueñas M1, Paramio JM, Serrano M. The pluripotency factor NANOG promotes the formation of squamous cell carcinomas. *Sci Rep*. 2015. 5:10205 (13 pp).
- Pan S**, Li Z, He Z, Qiu J, Zhou S. Molecular mechanisms for tumor resistance to chemotherapy. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2016. 43:723-737.
- Panosyan EH**, Lin HJ, Koster J, Lasky JL 3rd. In search of druggable targets for GBM amino acid metabolism. *BMC Cancer*. 2017. 17:162 (12 pp).
- Papanikolaou S**, Bravou V, Gyftopoulos K, Nakas D, Repanti M, Papadaki H. ILK expression in human basal cell carcinoma correlates with epithelial-mesenchymal transition markers and tumour invasion. *Histopathology*. 2010. 56:799-809.
- Patel RV**, Frankel A, Goldenberg G. An update on nonmelanoma skin cancer. *J Clin Aesthet Dermatol*. 2011. 4:20-27.
- Pérez-Gómez E**, del Castillo G, Santibáñez JF, López-Novoa JM, Bernabéu C, Quintanilla M. The role of the TGF- $\beta$  coreceptor Endoglin in cancer. *ScientificWorldJournal*. 2010. 10:2367-2384.
- Pérez-Gómez E**, Villa-Morales M, Santos J, Fernández-Piqueras J, Gamallo C, Dotor J, Bernabéu C, Quintanilla M. A role for endoglin as a suppressor of malignancy during mouse skin carcinogenesis. *Cancer Res*. 2007. 67:10268-10277.
- Pizarro A**, Benito N, Navarro P, Palacios J, Cano A, Quintanilla M, Contreras F, Gamallo C. E-cadherin expression in basal cell carcinoma. *Br J Cancer*. 1994. 69:157-162.
- Plaetzer K**, Krammer B, Berlanda J, Berr F, Kiesslich T. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. *Lasers Med Sci*. 2009. 24:259-268.

**Postiglione I**, Barra F, Aloj SM, Palumbo G. Photodynamic therapy with 5-aminolaevulinic acid and DNA damage: unravelling roles of p53 and ABCG2. *Cell Prolif*. 2016. 49:523-538.

**Poswar FO**, Fraga CA, Farias LC, Feltenberger JD, Cruz VP, Santos SH, Silveira CM, de Paula AM, Guimarães AL. Immunohistochemical analysis of TIMP-3 and MMP-9 in actinic keratosis, squamous cell carcinoma of the skin, and basal cell carcinoma. *Pathol Res Pract*. 2013. 209:705-709.

**Prowald A**, Cronauer MV, von Klot C, Eilers T, Rinnab L, Herrmann T, Spindler KD, Montenarh M, Jonas U, Burchardt M. Modulation of beta-catenin-mediated TCF-signalling in prostate cancer cell lines by wild-type and mutant p53. *Prostate*. 2007. 67:1751-1760.

**Qadir MI**. Skin cancer: Etiology and management. *Pak J Pharm Sci*. 2016. 29:999-1003.

**Qie S**, Diehl JA. Cyclin D1, cancer progression, and opportunities in cancer treatment. *J Mol Med*. 2016. 94:1313-1326.

**Quintanilla M**, del Castillo G, Sánchez-Blanco E, Martín-Villar E, Valbuena-Diez AC, Langa C, Pérez-Gómez E, Renart J, Bernabéu C. A suppressor role for soluble endoglin in cancer. *Cancer Cell & Microenvironment*. 2015. 2:e706 (6 pp).

**Raica M**, Cimpean AM, Ribatti D. The role of podoplanin in tumor progression and metastasis. *Anticancer Res*. 2008. 28:2997-3006.

**Ramos P**, Bentires-Alj M. Mechanism-based cancer therapy: Resistance to therapy, therapy for resistance. *Oncogene*. 2015. 34:3617-3626.

**Rapozzi V**, Della Pietra E, Bonavida B. Dual roles of nitric oxide in the regulation of tumor cell response and resistance to photodynamic therapy. *Redox Biology*. 2015. 6:311-317.

**Rapozzi V**, Jori G. Resistance to photodynamic therapy in cancer. *Springer*. 2015. 5:1-248. ISBN: 9783319127309.

**Raval CM**, Zhong JL, Mitchell SA, Tyrrell RM. The role of Bach1 in ultraviolet A-mediated human heme oxygenase 1 regulation in human skin fibroblasts. *Free Radic Biol Med*. 2012. 52:227-236.

**Rebucci M**, Michiels C. Molecular aspects of cancer cell resistance to chemotherapy. *Biochem Pharmacol*. 2013. 85:1219-1226.

**Reichrath J**, Rass K. Ultraviolet damage, DNA repair and vitamin D in nonmelanoma skin cancer and in malignant melanoma: an update. *Adv Exp Med Biol*. 2014. 810:208-233.

**Richter A**, Kelly B, Chow J, Liu D, Towers G, Dolphin D, Levy J. Preliminary studies on a more effective phototoxic agent than hematoporphyrin. *J Natl Cancer Inst*. 1987. 79:1327-1332.

**Robbins D**, Zhao Y. New aspects of mitochondrial Uncoupling Proteins (UCPs) and their roles in tumorigenesis. *Int J Mol Sci*. 2011. 12:5285-5293.

**Robey RW**, Steadman K, Polgar O, Bates SE. ABCG2-mediated transport of photosensitizers: potential impact on photodynamic therapy. *Cancer Biol Ther*. 2005. 4:187-194.

**Rodríguez Fernández JL**, Geiger B, Salomon D, Ben-Ze'ev A. Overexpression of vinculin suppresses cell motility in BALB/c 3T3 cells. *Cell Motil Cytoskeleton*. 1992a. 22:127-134.

**Rodríguez Fernandez JL**, Geiger B, Salomon D, Sabanay I, Zoller M, Ben-Ze'ev A. Suppression of tumorigenicity in transformed cells after transfection with vinculin cDNA. *J Cell Biol*. 1992b. 119:427-438.

**Rodríguez ME**, Cogno IS, Milla Sanabria LS, Morán YS, Rivarola VA. Heat shock proteins in the context of photodynamic therapy: autophagy, apoptosis and immunogenic cell death. *Photochem Photobiol Sci*. 2016. 15:1090-1102.

**Rolfs F**, Huber M, Kuehne A, Kramer S, Haertel E1, Muzumdar S, Wagner J, Tanner Y, Böhm F, Smola S, Zamboni N, Levesque MP, Dummer R, Beer HD, Hohl D, Werner S, Schäfer M. Nrf2 Activation Promotes Keratinocyte Survival during Early Skin Carcinogenesis via Metabolic Alterations. *Cancer Res*. 2015. 75:4817-4829.

**Rosenkranz AA**, Jans DA, Sobolev AS. Targeted intracellular delivery of photosensitizers to enhance photodynamic efficiency. *Immunol Cell Biol*. 2000. 78:452-464.

- Ruggero D.** Translational control in cancer etiology. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013. 5:a012336 (27 pp).
- Sadot E,** Geiger B, Oren M, Ben-Ze'ev A. Down-regulation of beta-catenin by activated p53. *Mol Cell Biol.* 2001. 21:6768-6781.
- Saito-Diaz K,** Chen TW, Wang X, Thorne CA, Wallace HA, Page-McCaw A, Lee E. The way Wnt works: Components and mechanism. *Growth Factors.* 2013. 31:1-31.
- Saldanha G,** Ghura V, Potter L, Fletcher A. Nuclear beta-catenin in basal cell carcinoma correlates with increased proliferation. *Br J Dermatol.* 2004. 151:157-164.
- Salim T,** Sjölander A, Sand-Dejmek J. Nuclear expression of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  and lack of membranous  $\beta$ -catenin is correlated with poor survival in colon cancer. *Int J Cancer.* 2013. 133:807-815.
- Satelli A,** Li S. Vimentin, an overview and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cell Mol Life Sci.* 2011. 68:3033-3046.
- Saunders NA,** Simpson F, Thompson EW, Hill MM, Endo-Munoz L, Leggatt G, Minchin RF, Guminski A. Role of intratumoral heterogeneity in cancer drug resistance: molecular and clinical perspectives. *EMBO Mol Med.* 2012. 4:675-684.
- Savoia P,** Deboli T, Previgliano A, Broganelli P. Usefulness of photodynamic therapy as a possible therapeutic alternative in the treatment of basal cell carcinoma. *Int J Mol Sci.* 2015. 16:23300-23317.
- Saxena M,** Stephens MA, Pathak H, Rangarajan A. Transcription factors that mediate epithelial-mesenchymal transition lead to multidrug resistance by upregulating ABC transporters. *Cell Death Dis.* 2011. 2:e179 (13 pp).
- Schellerer VS,** Langheinrich M, Hohenberger W, Croner RS, Merkel S, Rau TT, Stürzl M, Naschberger E. Tumor-associated fibroblasts isolated from colorectal cancer tissues exhibit increased ICAM-1 expression and affinity for monocytes. *Oncol Rep.* 2014. 31:255-261.
- Seebode C,** Lehmann J, Emmert S. Photocarcinogenesis and skin cancer prevention strategies. *Anticancer Res.* 2016. 36:1371-1378.
- Sellheyer K.** Basal cell carcinoma: cell of origin, cancer stem cell hypothesis and stem cell markers. *Br J Dermatol.* 2011. 164:696-711.
- Seshacharyulu P,** Ponnusamy MP, Haridas D, Jain M, Ganti AK, Batra SK. Targeting the EGFR signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets.* 2012. 16:15-31.
- Shang S,** Hua F, Hu ZW. The regulation of  $\beta$ -catenin activity and function in cancer: therapeutic opportunities. *Oncotarget.* 2017. 8:33972-33989.
- Shanley S,** McCormack C. Diagnosis and Management of Hereditary Basal Cell Skin Cancer. *Recent Results Cancer Res.* 2016. 205:191-212.
- Sharkey SM,** Wilson BC, Moorehead R, Singh G. Mitochondrial alterations in photodynamic therapy-resistant cells. *Cancer Res.* 1993. 53:4994-4999.
- Sharwani A,** Jerjes W, Hopper C, Lewis MP, El-Maaytah M, Khalil HS, MacRobert AJ, Upile T, Salih V. Photodynamic therapy down-regulates the invasion promoting factors in human oral cancer. *Arch Oral Biol.* 2006. 51:1104-1111.
- Shay G,** Lynch CC, Fingleton B. Moving targets: Emerging roles for MMPs in cancer progression and metastasis. *Matrix Biol.* 2015. 0:200-206.
- Shiga K,** Hara M, Nagasaki T, Sato T, Takahashi H, Takeyama H. Cancer-Associated Fibroblasts: their characteristics and their roles in tumor growth. *Cancers.* 2015. 7:2443-2458.
- Siddiqui MA,** Perry CM, Scott LJ. Topical methyl aminolevulinate. *Am J Clin Dermatol.* 2004. 5:127-137.
- Singh A,** Park H, Kangsamaksin T, Singh A, Readio N, Morris RJ. Keratinocyte stem cells and the targets for nonmelanoma skin cancer. *Photochem Photobiol.* 2012. 88:1099-1110.

**Singh G**, Espiritu M, Shen XY, Hanlon JG, Rainbow AJ. In vitro induction of PDT resistance in HT29, HT1376 and SK-N-MC cells by various photosensitizers. *Photochem Photobiol*. 2001. 73:651-656.

**Sneddon JB**, Zhen HH, Montgomery K, van de Rijn M, Tward AD, West R, Gladstone H, Chang HY, Morganroth GS, Oro AE, Brown PO. Bone morphogenetic protein antagonist gremlin 1 is widely expressed by cancer-associated stromal cells and can promote tumor cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006. 103:14842-14847.

**So PL**, Langston AW, Daniellinia N, Hebert JL, Fujimoto MA, Khaimskiy Y, Aszterbaum M, Epstein EH Jr. Long-term establishment, characterization and manipulation of cell lines from mouse basal cell carcinoma tumors. *Exp Dermatol*. 2006. 15:742-750.

**Song L**, Li ZY, Liu WP, Zhao MR. Crosstalk between Wnt/ $\beta$ -catenin and Hedgehog/Gli signaling pathways in colon cancer and implications for therapy. *Cancer Biol Ther*. 2015. 16:1-7.

**Spriggs KA**, Bushell M, Willis AE. Translational regulation of gene expression during conditions of cell stress. *Mol Cell*. 2010. 40:228-237.

**Stamatelli A**, Saetta AA, Bei T, Kavantzias N, Michalopoulos NV, Patsouris E, Aroni K. B-Raf mutations, microsatellite instability and p53 protein expression in sporadic basal cell carcinomas. *Pathol Oncol Res*. 2011. 17:633-637.

**Stemmler MP**. Cadherins in development and cancer. *Mol Biosyst*. 2008. 4:835-850.

**Stordal BK**, Davey MW, Davey RA. Oxaliplatin induces drug resistance more rapidly than cisplatin in H69 small cell lung cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2006. 58:256-265.

**Strnad H**, Lacina L, Kolár M, Cada Z, Vlcek C, Dvoránková B, Betka J, Plzák J, Chovanec M, Sáčková J, Valach J, Urbanová M, Smetana K Jr. Head and neck squamous cancer stromal fibroblasts produce growth factors influencing phenotype of normal human keratinocytes. *Histochem Cell Biol*. 2010. 133:201-211.

**Strutz F**, Okada H, Lo CW, Danoff T, Carone RL, Tomaszewski JE, Neilson EG. Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1. *J Cell Biol*. 1995. 130:393-405.

**Susan M**, Baldea I, Senila S, Macovei V, Dreve S, Ion RM, Cosgarea R. Photodamaging effects of porphyrins and chitosan on primary human keratinocytes and carcinoma cell cultures. *Int J Dermatol*. 2011. 50:280-286.

**Taguchi A**, Kawana K, Tomio K, Yamashita A, Isobe Y, Nagasaka K, Koga K, Inoue T, Nishida H, Kojima S, Adachi K, Matsumoto Y, Arimoto T, Wada-Hiraike O, Oda K, Kang JX, Arai H, Arita M, Osuga Y, Fujii T. Matrix metalloproteinase (MMP)-9 in cancer-associated fibroblasts (CAFs) is suppressed by omega-3 polyunsaturated fatty acids in vitro and in vivo. *PLoS One*. 2014. 9:e89605 (7 pp).

**Takahashi T**, Yamashita S, Matsuda Y, Kishino T, Nakajima T, Kushima R, Kato K, Igaki H, Tachimori Y, Osugi H, Nagino M, Ushijima T. ZNF695 methylation predicts a response of esophageal squamous cell carcinoma to definitive chemoradiotherapy. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2015. 141:453-463.

**Tang D**, Gao J, Wang S, Ye N, Chong Y, Huang Y, Wang J, Li B, Yin W, Wang D. Cancer-associated fibroblasts promote angiogenesis in gastric cancer through galectin-1 expression. *Tumour Biol*. 2016. 37:1889-1899.

**Teichgräber V**, Monasterio C, Chaitanya K, Boger R, Gordon K, Dieterle T, Jäger D, Bauer S. Specific inhibition of fibroblast activation protein (FAP)-alpha prevents tumor progression *in vitro*. *Adv Med Sci*. 2015. 60:264-272.

**Theodossiou TA**, Olsen CE, Jonsson M, Kubin A, Hothersall JS, Berg K. The diverse roles of glutathione-associated cell resistance against hypericin photodynamic therapy. *Redox Biol*. 2017. 12:191-197.

**Thiery JP**, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006. 7:131-142.

**Tilley C**, Deep G, Agarwal C, Wempe MF, Biedermann D, Valentová K, Kren V, Agarwal R. Silibinin and its 2,3-dehydro-derivative inhibit basal cell carcinoma growth via suppression of mitogenic signaling and transcription factors activation. *Mol Carcinog*. 2016. 55:3-14.

**Toftgård R**. Hedgehog signalling in cancer. *Cell Mol Life Sci*. 2000. 57:1720-1731.

**Tomita H**, Tanaka K, Tanaka T, Hara A. Aldehyde dehydrogenase 1A1 in stem cells and cancer. *Oncotarget*. 2016. 7:11018-11032.

**Traverso N**, Ricciarelli R, Nitti M, Marengo B, Furfaro AL, Pronzato MA, Marinari UM, Domenicotti C. Role of glutathione in cancer progression and chemoresistance. *Oxid Med Cell Longev*. 2013. 2013:972913 (10 pp).

**Tucci MG**, Lucarini G, Zizzi A, Rocchetti R, Brancorsini D, Di Primio R, Ricotti F, Ricotti G. Cdc42 is involved in basal cell carcinoma carcinogenesis. *Arch Dermatol Res*. 2013. 305:835-840.

**Valcz G**, Sipos F, Tulassay Z, Molnar B, Yagi Y. Importance of carcinoma-associated fibroblast-derived proteins in clinical oncology. *J Clin Pathol*. 2014. 67:1026-1031.

**van der Pols JC**, Xu C, Boyle GM, Parsons PG, Whiteman DC, Green AC. Expression of p53 tumor suppressor protein in sun-exposed skin and associations with sunscreen use and time spent outdoors: a community-based study. *Am J Epidemiol*. 2006. 163:982-988.

**van Roy F**, Berx G. The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cell Mol Life Sci*. 2008. 65:3756-3788.

**van Scott EJ**, Reinertson RP. The modulating influence of stromal environment on epithelial cells studied in human autotransplants. *J Invest Dermatol*. 1961. 36:109-131.

**van Straten D**, Mashayekhi V, de Bruijn HS, Oliveira S, Robinson DJ. Oncologic photodynamic therapy: basic principles, current clinical status and future directions. *Cancers*. 2017. 9:E19 (54 pp).

**Villodre ES**, Kipper FC, Pereira MB, Lenz G. Roles of OCT4 in tumorigenesis, cancer therapy resistance and prognosis. *Cancer Treat Rev*. 2016. 51:1-9.

**Visvader JE**, Lindeman GJ. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer*. 2008. 8:755-768.

**Wan MT**, Lin JY. Current evidence and applications of photodynamic therapy in dermatology. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2014. 7:145-163.

**Wang GY**, Wang J, Mancianti ML, Epstein EH Jr. Basal cell carcinomas arise from hair follicle stem cells in Ptch1(+/-) mice. *Cancer Cell*. 2011. 19:114-124.

**Wang SS**, Jiang J, Liang XH, Tang YL. Links between cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition. *Onco Targets Ther*. 2015. 8:2973-2980.

**Wee B**, Pietras A, Ozawa T, Bazzoli E, Podlaha O, Antczak C, Westermarck B, Nelander S, Uhrbom L, Forsberg-Nilsson K, Djaballah H, Michor F, Holland EC. ABCG2 regulates self-renewal and stem cell marker expression but not tumorigenicity or radiation resistance of glioma cells. *Sci Rep*. 2016. 6:25956 (9 pp).

**Weina K**, Utikal J. SOX2 and cancer: current research and its implications in the clinic. *Clin Transl Med*. 2014. 3:19 (10 pp).

**Welsh MM**, Karagas MR, Kuriger JK, Houseman A, Spencer SK, Perry AE, Nelson HH. Genetic determinants of UV-susceptibility in non-melanoma skin cancer. *PLoS One*. 2011. 6:e20019 (9 pp).

**Westover D**, Li F. New trends for overcoming ABCG2/BCRP-mediated resistance to cancer therapies. *J Exp Clin Cancer Res*. 2015. 34:159-168.

**Wilson BC**, Olivo M, Singh G. Subcellular localization of photofrin and aminolevulinic acid and photodynamic cross-resistance in vitro in radiation-induced fibrosarcoma cells sensitive or resistant to photofrin-mediated photodynamic therapy. *Photochem Photobiol*. 1997. 65:166-176.

**Wiznia LE**, Federman DG. Treatment of basal cell carcinoma in the elderly: what non-dermatologists need to know. *Am J Med*. 2016. 129:655-660.

**Wojciechowska-Zdrojowy M**, Szepietowski JC, Matusiak Ł, Dzięgiel P, Puła B. Expression of Podoplanin in non-melanoma skin cancers and actinic keratosis. *Anticancer Res*. 2016. 36:1591-1597.



- Won HS**, Lee KM, Oh JE, Nam EM, Lee KE. Inhibition of  $\beta$ -Catenin to overcome endocrine resistance in tamoxifen-resistant breast cancer cell line. *PLoS One*. 2016. 11:e0155983 (13 pp).
- Wu F**, Ye X, Wang P, Jung K, Wu C, Douglas D, Kneteman N, Bigras G, Ma Y, Lai R. Sox2 suppresses the invasiveness of breast cancer cells via a mechanism that is dependent on Twist1 and the status of Sox2 transcription activity. *BMC Cancer*. 2013. 13:317 (11 pp).
- Wu Q**, Yang Z, Nie Y, Shi Y, Fan D. Multi-drug resistance in cancer chemotherapeutics: mechanisms and lab approaches. *Cancer Lett*. 2014. 347:159-166.
- Wu X**, Elkin EE, Marghoob AA. Burden of basal cell carcinoma in USA. *Future Oncol*. 2015. 11:2967-2974.
- Xing F**, Saidou J, Watabe K. Cancer associated fibroblasts (CAFs) in tumor microenvironment. *Front Biosci*. 2010. 15:166-179.
- Xu W**, Hu X, Chen Z, Zheng X, Zhang C, Wang G, Chen Y, Zhou X, Tang X, Luo L, Xu X, Pan W. Normal fibroblasts induce E-cadherin loss and increase lymph node metastasis in gastric cancer. *PLoS One*. 2014. 9:e97306 (12 pp).
- Xue G**, Romano E, Massi D, Mandalà M. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in melanoma: Preclinical rationale and novel therapeutic insights. *Cancer Treat Rev*. 2016. 49:1-12.
- Yamamoto M**, Fujita H, Katase N, Inoue K, Nagatsuka H, Utsumi K, Sasaki J, Ohuchi H. Improvement of the efficacy of 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic treatment in human oral squamous cell carcinoma HSC-4. *Acta Med Okayama*. 2013. 67:153-164.
- Yang SH**, Andl T, Grachtchouk V, Wang A, Liu J, Syu LJ, Ferris J, Wang TS, Glick AB, Millar SE, Dlugosz AA. Pathological responses to oncogenic Hedgehog signaling in skin are dependent on canonical Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *Nat Genet*. 2008. 40:1130-1135.
- Yang X**, Palasuberniam P, Kraus D, Chen B. Aminolevulinic acid-based tumor detection and therapy: molecular mechanisms and strategies for enhancement. *Int J Mol Sci*. 2015. 16:25865-25880.
- Yang XY**, Zhang D, Zou QF, Fan F, Shen F. Association of tumor-associated fibroblasts with progression of hepatocellular carcinoma. *Med Oncol*. 2013. 30:593 (6 pp).
- Yerebakan O**, Ciftcioglu MA, Akkaya BK, Yilmaz E. Prognostic value of Ki-67, CD31 and epidermal growth factor receptor expression in basal cell carcinoma. *J Dermatol*. 2003. 30:33-41.
- Yewale C**, Baradia D, Vhora I, Patil S, Misra A. Epidermal growth factor receptor targeting in cancer: a review of trends and strategies. *Biomaterials*. 2013. 34:8690-8707.
- Youssef KK**, Van Keymeulen A, Lapouge G, Beck B, Michaux C, Achouri Y, Sotiropoulou PA, Blanpain C. Identification of the cell lineage at the origin of basal cell carcinoma. *Nat Cell Biol*. 2010. 12:299-305.
- Yow CM**, Wong CK, Huang Z, Ho RJ. Study of the efficacy and mechanism of ALA-mediated photodynamic therapy on human hepatocellular carcinoma cell. *Liver Int*. 2007. 27:201-208.
- Yu CH**, Yu CC. Photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid (ALA) impairs tumor initiating and chemo-resistance property in head and neck cancer-derived cancer stem cells. *PLoS One*. 2014. 9:e87129 (7 pp).
- Yu Z**, Pestell TG, Lisanti MP, Pestell RG. Cancer stem cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 2012. 44:2144-2151.
- Zamarrón A**, Lucena SR, Salazar N, Sanz-Rodríguez F, Jaén P, Gilaberte Y, González S, Juarranz Á. Isolation and characterization of PDT-resistant cancer cells. *Photochem Photobiol Sci*. 2015. 14:1378-1389.
- Zawacka-Pankau J**, Krachulec J, Grulkowski I, Bielawski KP, Selivanova G. The p53-mediated cytotoxicity of photodynamic therapy of cancer: recent advances. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2008. 232:487-497.
- Zbacnik AP**, Rawal A, Lee B, Werling R, Knapp D, Mesa H. Cutaneous basal cell carcinosarcoma: case report and literature review. *J Cutan Pathol*. 2015. 42:903-910.

**Zeineddine D**, Hammoud AA, Mortada M, Boeuf H. The Oct4 protein: more than a magic stemness marker. *Am J Stem Cells*. 2014. 3:74-82.

**Zhang H**, Shen B, Swinarska JT, Li W, Xiao K, He P. 9-Hydroxypheophorbide  $\alpha$ -mediated photodynamic therapy induces matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 down-regulation in Hep-2 cells via ROS-mediated suppression of the ERK pathway. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2014a. 11:55-62.

**Zhang P**, Liu H, Xia F, Zhang QW, Zhang YY, Zhao Q, Chao ZH, Jiang ZW, Jiang CC. Epithelial-mesenchymal transition is necessary for acquired resistance to cisplatin and increases the metastatic potential of nasopharyngeal carcinoma cells. *Int J Mol Med*. 2014b. 33:151-159.

**Zhou B**, Chen WL, Wang YY, Lin ZY, Zhang DM, Fan S, Li JS. A role for cancer-associated fibroblasts in inducing the epithelial-to-mesenchymal transition in human tongue squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2014. 43:585-592.

**Zi F**, He J, He D, Li Y, Yang L, Cai Z. Fibroblast activation protein  $\alpha$  in tumor microenvironment: recent progression and implications. *Mol Med Rep*. 2015. 11:3203-3211.

**Zlatarova ZI**, Softova EB, Dokova KG, Messmer EM. Expression of matrix metalloproteinase-1, -9, -13, and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in basal cell carcinomas of the eyelid. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2012. 250:425-431.

**Zmijewski JW**, Jope RS. Nuclear accumulation of glycogen synthase kinase-3 during replicative senescence of human fibroblasts. *Aging Cell*. 2004. 3:309-317.

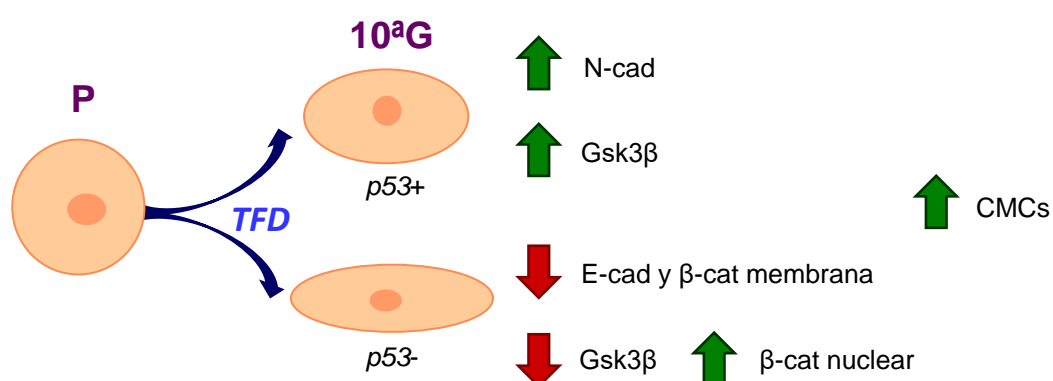


8

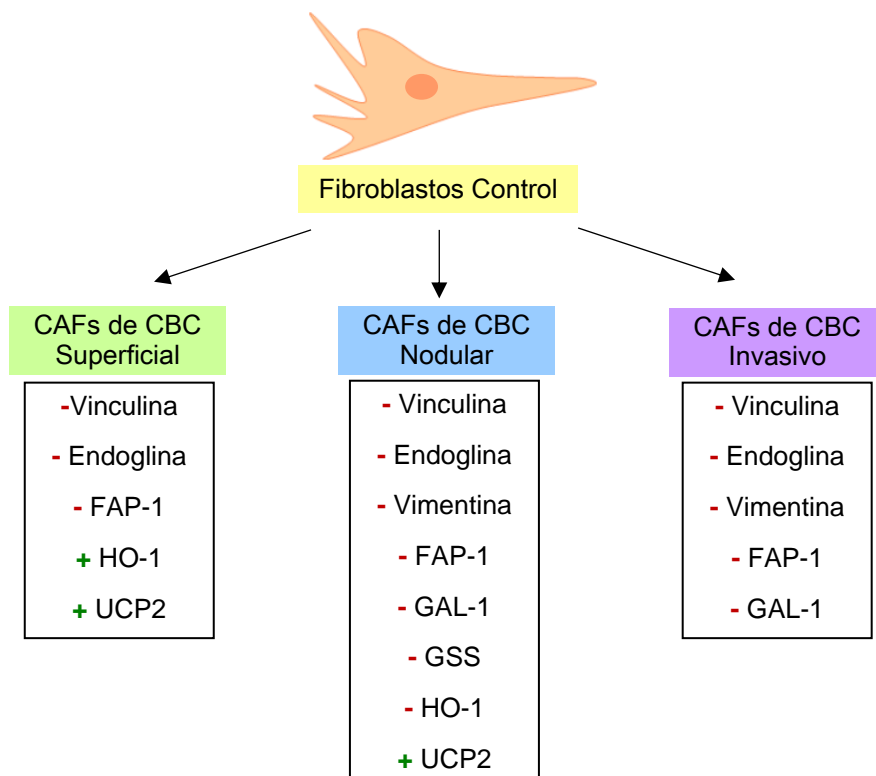
Anexos

Grupo	Muestra	Marcadores de carcinogénesis				
		P53	EGFR	Sox2	PDPN	α-SMA
Control		Capa basal epidermis	Epidermis, señal más intensa en la capa basal	Capa basal de la epidermis	Capa basal de la epidermis y vasos linfáticos	Capa basal de la epidermis y vasos
Superficial	SL07	Células de la capa basal de la epidermis	Lesión neoplásica, señal más intensa en la zona basal	Alguna célula del tumor	Capa basal de la epidermis y vasos linfáticos	Zonas del estroma y vasos
	SL08	Alguna célula del tumor			Vasos linfáticos	Tumor y vasos
	SL09	Células de la epidermis			Capa basal de la epidermis y vasos linfáticos	Vasos
Nodular	SL04	En algunas células de la masa tumoral	Tumor	Periferia de los nódulos del tumor	Capa basal de la epidermis y vasos linfáticos	Tumor, vasos y estroma
	SL06			No expresión		Estroma y vasos
	SL14	Tumor			Tumor y vasos linfáticos	Tumor, vasos y estroma
Invasivo	SL10	No expresión	Tumor	No expresión	No expresión	Tumor, vasos y estroma
	SL11	Zonas del tumor		Algunas células de la epidermis	Vasos linfáticos	
	SL12			No expresión		Tumor
	SL15	No expresión			Capa basal de la epidermis y vasos linfáticos	Tumor, vasos y estroma

**Anexo 1** Expresión de marcadores relacionados con carcinogénesis en diferentes tipos de CBC. Se resumen los resultados obtenidos de las IHQs de los CBCs a partir de los cuales fueron aislados los fibroblastos empleados en el estudio.



**Anexo 2** Modelos de resistencia del CBC a TFD dependientes de la expresión de p53. Se resumen los dos modelos propuestos de resistencia del CBC a TFD. Las células resistentes a TFD que expresan p53 (ASZ) sufren un ligero alargamiento y aumentan su expresión de N-cadherina y Gsk3β. Las células resistentes que no expresan p53 (BSZ y CSZ) sufren un alargamiento más pronunciado de su morfología y disminuyen la expresión de proteínas de adhesión (E-cad y β-cat en membrana), mientras que disminuyen la de Gsk3β y aumentan la β-cat nuclear, indicando un aumento de la actividad de la ruta Wnt/β-cat. Ambos modelos van asociados a un aumento de marcadores de CMCs.



**Anexo 3** Expresión de genes en fibroblastos aislados a partir de distintos tipos de CBC. Se resumen las diferencias de expresión de diversos genes en fibroblastos asociados a CBC (superficial, nodular e invasivo) respecto a los fibroblastos control. Se indica con un signo - la disminución en la expresión respecto al control y con un signo + el aumento.



En el periodo de desarrollo de esta Tesis Doctoral he colaborado en la realización de las siguientes publicaciones relacionadas directamente con el tema de este trabajo:

- Alicia Zamarrón, **Silvia Rocío Lucena**, Nerea Salazar, Francisco Sanz-Rodríguez, Pedro Jaén, Yolanda Gilaberte, Salvador González, Ángeles Juarranz. "Isolation of resistant cells to photodynamic therapy". *Photochemical & Photobiological Sciences*. 2015. 14:1378-1389. DOI: 10.1039/C4PP00448E

- **Silvia Rocío Lucena**, Nerea Salazar, Tamara Gracia-Cazaña, Alicia Zamarrón, Salvador González, Ángeles Juarranz, Yolanda Gilaberte. "Combined treatments with Photodynamic Therapy for non-melanoma skin cancer". *International Journal of Molecular Sciences*. 2015. 16:25912-25933. DOI: 10.3390/ijms161025912.

-Tamara Gracia-Cazaña, Nerea Salazar, Alicia Zamarrón, Marta Mascaraque, **Silvia Rocío Lucena**, Ángeles Juarranz. "Resistance of nonmelanoma skin cancer to nonsurgical treatments. Part II: photodynamic therapy, vismodegib, cetuximab, intralesional methotrexate and radiotherapy." *Actas Dermo-Sifiliográficas*. 2016. 107:740-750. DOI: 10.1016/j.ad.2016.04.020